



Salvador Dalí (1931): *Die zerrinnende Zeit*

Molekulare Uhren Spiegelmoleküle und der Zahn der Zeit

Molekulare Uhren, Spiegelmoleküle und der Zahn der Zeit

Aminosäuren und Alterung

Von Hans Brückner, Jochen Kirschbaum und Ralf Pätzold

Vorgänge bei der Alterung und der zeitliche Ablauf der zugrunde liegenden Prozesse betreffen jeden von uns und stehen im Brennpunkt der Forschung. Deshalb werden zuverlässige molekulare Marker benötigt, welche diese biochemischen Vorgänge sicher und quantitativ erfassen. Es wird gezeigt, wie die zeitabhängigen, strukturellen Veränderungen von Aminosäuren als „molekulare Uhren“ für diese Zwecke benutzt werden können und welche Konsequenzen sich aus den unaufhaltsam ablaufenden Änderungen der Proteinstrukturen aller Lebewesen ergeben.

„L'univers est un ensemble dissymétrique, et je suis persuadé que la vie, telle qu'elle se manifeste à nous, est fonction de la dissymétrie de l'univers ou des conséquences qu'elle entraîne. L'univers est dissymétrique...“ (Louis Pasteur)

Das vergängliche Wesen der Zeit sowie die ständige Veränderung der Gegenwart war schon in der Antike Gegenstand philosophischer Betrachtungen. So wird Heraklit von Ephesos (ca. 540 bis 480 v. Chr.) der Satz „Alles fließt“ zugeschrieben. In der Neuzeit hat sich unter anderem der spanische Künstler Salvador Dalí in seinen Gemälden immer wieder mit dem zeitlichen Vergehen aller Dinge befasst und dies recht eindrücklich in seinem 1931 geschaffenen Werk „La persistance de la mémoire“ („Die Beständigkeit der Erinnerung“ oder auch: „Die zerrinnende Zeit“) dargestellt. Seine öfters wiederkehrenden „zerfließenden Uhren“ sind als Versinnbildlichung der Vergänglichkeit geeignet, jedoch weder als exakte Zeitmesser noch zur Messung der biologischen Alterung von Organismen brauchbar. Hier wäre es wünschenswert und von praktischem Interesse, Methoden zu haben, mit denen man die zeitabhängigen strukturellen Veränderungen von Molekülen erfassen könnte. Die Messungen dieser Veränderungen könnten dann als „Biochronometer“ oder „Molekulare Uhren“ über die gesamte Lebensdauer eines Organismus verwendet werden.

Die meisten Biomoleküle unterliegen jedoch einem raschen Auf- und Abbau oder haben effektive Reparaturmechanismen, die den Ausgangszustand wieder herstellen, und sind damit für oben

genannte Zwecke wenig geeignet. Bei Säugetieren – und damit auch dem Menschen – gibt es jedoch aus Aminosäuren aufgebaute Proteine oder Eiweißstoffe genannte Biopolymere, die eine sehr lange Lebensdauer besitzen und nur einmal in bestimmten Lebensphasen gebildet werden.

Solche Proteine sind z. B. die Collagene, welche die elastischen Gerüstsubstanzen von Knorpel, Sehnen und Bindegewebe darstellen. Auch die als Crystalline bezeichneten Augenlinsenproteine werden nur einmal geformt. Dergleichen wird das Dentin der Zahnwurzel, welches ein Agglomerat des Collagens mit Mineralsalzen darstellt, nur einmal in der Jugendphase gebildet.

Bausteine aller Proteine sind zwanzig durch Basen-Triplets im genetischen Code der DNA oder RNA festgelegte, so genannte proteinogene α -Aminosäuren. Diese bilden durch ribosomal erfolgende Polykondensation und gegebenenfalls posttranslationale Modifikationen die Tausende von Proteinstrukturen, welche für Struktur, Funktion und enzymatisch gesteuerte Stoffwechselfvorgänge aller Lebewesen mit verantwortlich sind.

Chemisch definiert sind die Protein-Aminosäuren durch ein tetraedrisches Kohlenstoffatom, an das jeweils eine Aminogruppe ($-\text{NH}_2$), eine Carboxygruppe ($-\text{COOH}$), ein Wasserstoffatom ($-\text{H}$) sowie eine variabler Rest ($-\text{R}$) ge-

bunden ist. Es entsteht ein Kohlenstoffatom mit vier verschiedenen Substituenten, welches deshalb auch als asymmetrisches Kohlenstoffatom bezeichnet wird. Die einzige Ausnahme stellt die einfachste Aminosäure Glycin dar, da hier der variable Rest ein H-Atom ist, so dass kein asymmetrisches C-Atom vorliegt.

Von jeder Aminosäure gibt es nun generell zwei räumliche Strukturen, die sich zunächst nur in ihrer Eigenschaft unterscheiden, linear polarisiertes, d. h. im Gegensatz zum Sonnenlicht nur in eine Ebene schwingendes Licht, entweder nach links oder rechts zu drehen. Diese Aminosäuren werden deshalb auch als „optisch aktive“ Aminosäuren bezeichnet. Bemerkenswert ist, dass nur eine Form dieser Aminosäuren zur Proteinsynthese verwendet wird. Diese in der Natur dominierenden Aminosäuren werden als L-Aminosäuren bezeichnet. Zu jeder L-Aminosäure gibt es eine Form, die als D-Aminosäure bezeichnet wird und welche linear polarisiertes Licht um genau denselben Betrag entgegengesetzt dreht. Die Moleküle der L-Form und der D-Form verhalten sich exakt wie Bild und Spiegelbild und lassen sich nicht zur Deckung bringen. Ähnlich stellen die rechte und die linke Hand Spiegelbilder dar, deren Deckung nicht möglich ist. Man spricht deshalb auch von der Chiralität oder Händigkeit von Molekülen (gr. *cheiros* =

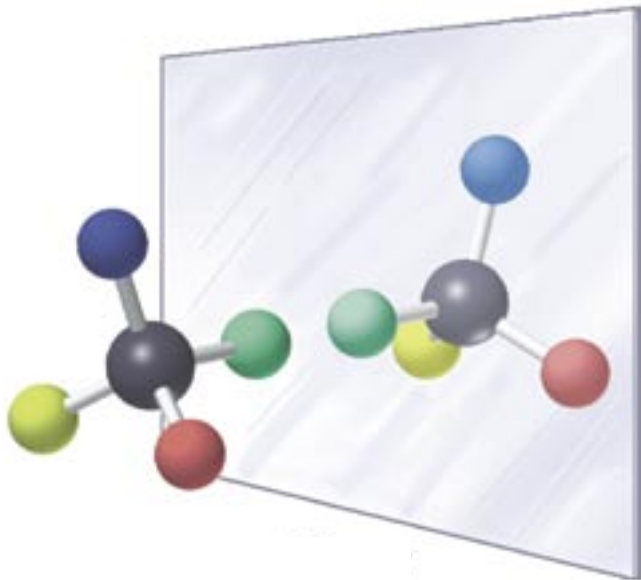
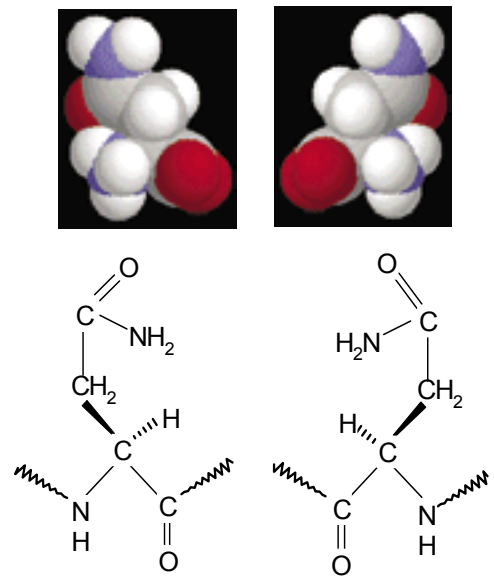


Abb. 1: (a) Bild und Spiegelbild eines optisch aktiven, sog. chiralen Moleküls, wobei die vier verschiedenen Substituenten am tetraedrischen C-Atom durch Kugeln verschiedener Farben dargestellt sind. Es ist nicht möglich, Bild und Spiegelbild vollständig zur Deckung zu bringen. Im Falle von Aminosäuren wären die Substituenten jeweils eine Aminogruppe (NH₂), Carboxygruppe (COOH), Wasserstoff (H)-Atom und eine für jede der 20 proteinbildenden Aminosäuren charakteristische Gruppe R.



(b) Molekülmodelle der im Text besonders erwähnten Aminosäure Asparagin, wobei oben die in Proteinen enthaltene Aminosäure L(+)-Asparagin (links) und deren Spiegelbild, das D(-)-Asparagin (rechts), dargestellt ist. Unten ist die chemische Struktur der im Proteinverband (geschlängelte Linie) gebundenen L-Asparagin (links) und des Spiegelbildes D-Asparagin dargestellt.



Prof. Dr. rer. nat. habil. Hans Brückner
 Institut für Ernährungswissenschaft
 Interdisziplinäres Forschungszentrum (IFZ)
 Heinrich-Buff-Ring 26, 35392 Gießen
 Telefon: 0641 99-39141
 hans.brueckner@ernaehrung.uni-giessen.de

Hans Brückner, Jahrgang 1944, mehrjährige Berufstätigkeiten u. a. Chemisches Landesuntersuchungsamt Reutlingen, Max-Planck-Institut für Virusforschung Tübingen und IBM/Sindelfingen, 1968 – 1971 Tätigkeit als Chemie-Ingenieur in der Pharmaforschung von Ciba/Basel, 1971 – 1977 Chemie- und Werkstudium an der Universität Tübingen u. a. gefördert durch Stipendien der Dr. Gadiant-Engi-Stiftung/Ciba und Hermann-Schlosser-Stiftung/Degussa; 1979 Promotion über mikrobielle Peptidantibiotika im Sonderforschungsbereich „Chemie und Biologie von Mikroorganismen“, 1980 – 1981 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im SFB in Tübingen, Patente zur Calcitonin- und Interferon-Synthese, 1982 Wechsel an das Institut für Lebensmitteltechnologie der Universität Hohenheim und 1985 Habilitation in chemischer Lebensmitteltechnologie; 1989 Ajinomoto Prize for Amino Acid Research, 1991 apl. Professor und 1991 – 1995 Vertreter der Hohenheimer Professur für Milchtechnologie, 1995 – 1998 Projektleiter des EU-Projektes ‚Use of Camels in Arid Regions as Potential Sources for Milk and Meat Production‘ u. a. mit Partnern in Kenia und Äthiopien; Herbst 1995 Rufannahme der Professur für Lebensmittelwissenschaften der Universität Gießen. Arbeitsgebiete insbesondere Chemie und Analytik von Lebensmitteln und physiologischen Proben, Stereochemie von Aminosäuren als molekulare Marker in Life Sciences, Strukturaufklärung und Wirkungsprüfung von Polypeptidantibiotika aus Schimmelpilzen. Langjähriges Mitglied im Editorial Board der Zeitschriften ‚Amino Acids‘ und ‚Chromatographia‘.

Hand). Zugehöriges Bild und Spiegelbild werden auch als optische Isomere oder Enantiomere bezeichnet. Liegen L- und D-Formen in einem Gemisch in genau derselben Menge vor, heben sich die Links- und Rechtsdrehung von polarisiertem Licht auf. Man spricht dann von einem Razemat. Den teilweisen Übergang von der einen in die andere Form bezeichnet man häufig ebenfalls als Razemisierung oder – korrekter – Enantiomerisierung.

Für die mit Aminosäurechemie weniger Vertrauten lassen sich die vier verschiedenen Substituenten auch durch vier verschiedenfarbige Kugeln an einem Tetraeder darstellen (Abb. 1a): Bild und Spiegelbild sind nicht zur Deckung zu bringen. Dieser Befund lässt sich mit den Enantiomeren, d. h. Bild und Spiegelbild der Asparaginsäure, chemisch korrekt darstellen. Da Aminosäuren und die daraus gebildeten Proteine räumliche Gebilde definierter Strukturen darstellen, hat ein teilweiser oder vollständiger Übergang einer oder mehrerer L- in die D-Aminosäure zur Folge, dass solche Proteinstrukturen gestört werden. Eine weitere Folge wäre, dass solche molekular veränderten Pro-

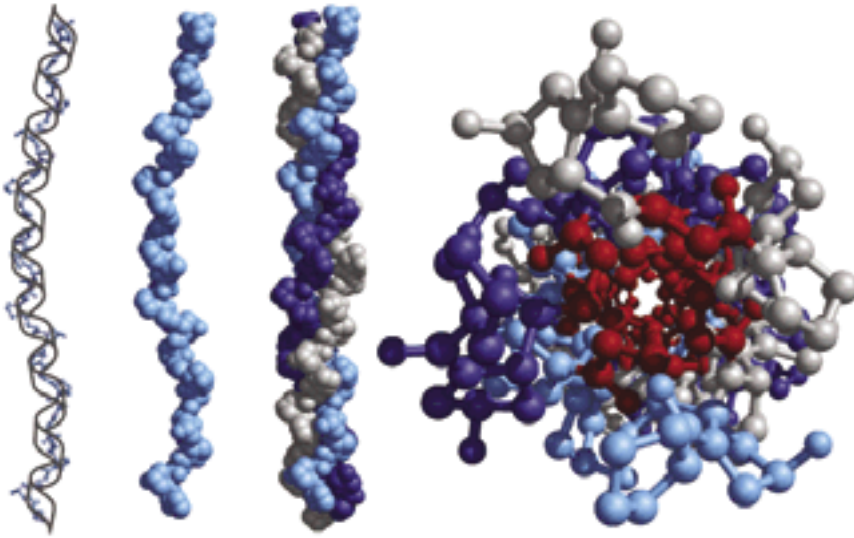


Abb. 2: Molekülmodelle von Collagenmolekülen gebildet durch die Zusammenlagerung dreier linksgänger Einzelhelices zu einer Tripelhelix. Links sind die Seitenansichten dargestellt, ganz rechts ist die Draufsicht gezeigt. Hier sind auch gut die in rot dargestellten, sich alle innen befindlichen Glycin-Moleküle zu sehen, welche die dichte Packung der Helix ermöglichen. Jede Positionsänderung des Glycins im Protein führt zu einer Strukturänderung des Proteins.

teine die vorgesehene Funktion nicht mehr oder nur unvollständig erfüllen könnten.

Im Extremfall könnte es zu degenerativen Veränderungen der entsprechenden Organe kommen. Als Beispiel sei die durch Razemisierung von Aminosäuren erfolgende Veränderung der Struktur des wichtigen und langlebigen Gerüstproteins Collagen gezeigt (wobei zu berücksichtigen ist, dass es mehrere Typen von Collagen unterschiedlichen Aufbaus und unterschiedlicher Funktion gibt). Die Collagene machen etwa 25 % der Proteinmasse des menschlichen Körpers aus.

Das häufigste Collagen vom so genannten Typ 1 besteht überwiegend aus sich wiederholenden Reihenfolgen (Sequenzen) der Aminosäuren Glycin, Hydroxyprolin und Prolin, wobei diese gelegentlich durch andere Proteinamino-säuren unterbrochen sind. Die aus etwa 1200 Aminosäuren gebildeten Collagenmoleküle bilden selbsttätig eine schraubenförmige Struktur aus, die als Helix bezeichnet wird. Drei dieser Helices lagern sich zu einer dicht gepackten Struktur zusammen, die Tripelhelix genannt wird. Diese dichteste Packung erfordert, dass alle Glycine der Innenseite der Helix zugewandt sind (Abb. 2).

Aus der Struktur ist offensichtlich, dass jeder Ersatz von Glycin durch eine andere Aminosäure, jeder Platzwechsel des Glycins im Molekül oder jeder

Professur für Lebensmittelwissenschaften

In der Lehre vermittelt die Professur mit ihren Mitarbeitern den Studierenden der Ökotrophologie und Ernährungswissenschaften im Rahmen entsprechender Kern- und Profilierungsmodulen Kenntnisse der Zusammensetzung und Herstellung insbesondere von pflanzlichen Lebensmitteln einschließlich der zugrunde liegenden lebensmittelrechtlichen Bestimmungen. Vermittelt werden auch traditionelle Verfahren und neue Technologien, die zur Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln eingesetzt werden, und die Konsequenzen, die sich aus der Bildung oder Kontamination von Lebensmitteln mit potentiell toxischen Substanzen ergeben. Begleitend wird ein lebensmittelchemisches Praktikum für Studierende angeboten. In der Forschung werden Lebensmittelinhaltsstoffe (insbesondere natürliche und künstliche Farbstoffe, Aminosäuren und Peptide) und deren prozessbedingte Veränderungen untersucht sowie die Verwendung molekularer Marker zur Qualitäts- und Authentizitätskontrolle von Lebensmitteln geprüft. In diesem Zusammenhang werden auch die stereochemischen und biologischen Konsequenzen erforscht, die sich aus der MAILLARD-Reaktion – das ist die komplexe Reaktion von Zuckern mit Aminosäuren, Peptiden und Proteinen – ergeben. Diese Fragestellungen werden vielfach in Kooperation mit industriellen Partnern bearbeitet.

Weitere Forschungsschwerpunkte sind die Isolierung, Strukturaufklärung und Bioaktivitätsprüfungen einer speziellen Klasse von Polypeptiden aus in unserem mikrobiologischen Labor kultivierten Schimmelpilzen, mit dem Ziel, neue Antibiotika aufzufinden. Hierzu wurden effiziente und rasche (high-throughput) Methoden etabliert und der Bereich der ‚Peptaibiotics‘ für diese Gruppe bioaktiver Wirksubstanzen definiert.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen wurde eine Analysenplattform etabliert, bestehend aus Hochleistungs-Analysengeräten wie Kapillargaschromatographie mit massenspektrometrischen oder Flammenionisations-Detektoren, Massenspektrometrie, Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit variablem Diodenarray-, UV- oder Fluoreszenzdetektoren und HPLC gekoppelt mit Elektrosprayionisations-Tandem-Massenspektrometrie. Die Geräte und Einrichtungen stehen auch Studierenden zur Ausbildung und Anfertigung von Master-Arbeiten und Doktoranden zur Weiterqualifikation zur Verfügung.

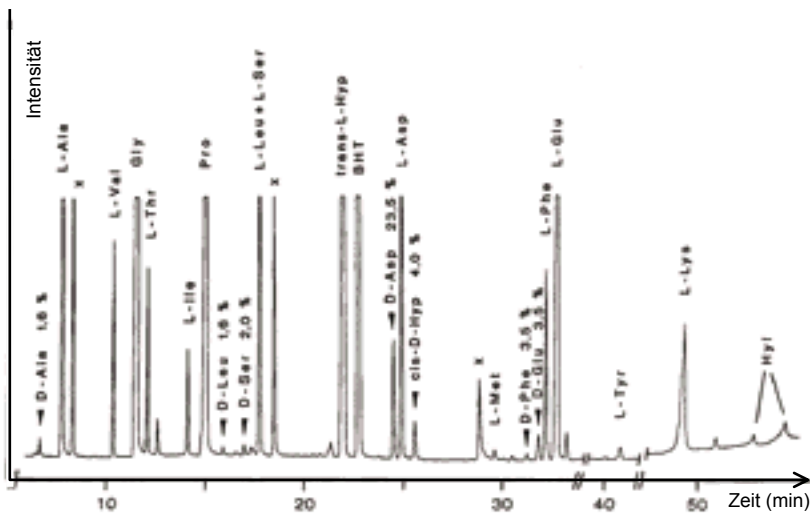


Abb. 3: Trennung der D- und L-Aminosäuren welche bei der zur Analyse erforderlichen vollständigen Hydrolyse eines aus Rinderknochen gewonnenen Gelatineproduktes freigesetzt wurden. Pfeile weisen auf die jeweils gebildeten D-Aminosäuren hin. Zu beachten sind die relativ großen Mengen an gebildeter D-Asparaginsäure (D-Asp) und das aus trans-L-Hydroxyprolin (trans-L-Hyp) gebildete cis-D-Hydroxyprolin (cis-D-Hyp). Die Trennung erfolgte mittels Gaschromatographie an einer optisch aktiven Phase (Chirasil-L-Val).

Übergang einer Aminosäure von der üblicherweise vorliegenden L-Form in die D-Form zu einer Strukturänderung des Collagens führt. Diese kann, infolge der metabolischen Langlebigkeit des Collagens, zu degenerativen Erkrankungen führen (Erbe & Brückner 1999). Eine Methode zur analytischen Trennung von L- und D-Aminosäuren eines collagenhaltigen Materials nach voll-

ständiger Hydrolyse ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die in einer Gleichgewichtsreaktion erfolgende Umwandlung der L-Form in die D-Form (und umgekehrt) erfolgt nach einer monomolekularen Kinetik 1. Ordnung. Der entsprechenden Formel lässt sich entnehmen, dass diese Umwandlung proportional zur Zeit und damit zur Lebensdauer ist. Damit

kann über die Geschwindigkeitskonstante und die Messung der Verhältnisse der D- zu den L-Formen der Aminosäuren die Zeit der Umwandlung und damit das Alter einer biologischen Probe bestimmt werden. Die rascheste Umwandlung von der L-Form in die D-Form zeigen das Asparagin und die daraus durch Hydrolyse leicht gebildete Asparaginsäure. Deshalb wird letztere bevorzugt als Biomarker eingesetzt.

Das Dentin des Zahnes besteht aus Aggregaten von etwa 70 % mineralischen Bestandteilen wie z. B. Hydroxylapatit und 20 % Collagen Typ 1. Auch hier läuft die Isomerisierung und Enantiomerisierung (Razemisierung) von α -Aminosäuren unabdingbar ab, wobei wiederum die Menge der gebildeten D-Asparaginsäure als Biochronometer oder „Molekulare Uhr“ dienen kann. Vorteilhaft ist, dass während der Lebensdauer eines Organismus die Mundhöhlentemperatur ziemlich konstant bei 37 °C liegt, so dass der Einfluss von Temperaturunterschieden nicht berücksichtigt werden muss. Eine gute Korrelation zwischen der Menge der gebildeten D-Asparaginsäure und dem Alter wurde unabhängig durch verschiedene Arbeitsgruppen gefunden, und ein Beispiel ist hier gezeigt (Abb. 4a) (Ritz-Timme et al. 2002). In der forensischen Chemie ist diese Altersbestimmung z. B. von Interesse, da *post mortem* eine rasche Abkühlung auf Umgebungstemperatur erfolgt und die Aminosäure-Datierung, wie dargelegt, Aufschluss über das Alter eines Probanden oder Opfers geben kann.

Ein weiteres Beispiel ist ein metabolisch stabiles Protein der Augenlinse, welches als Crystallin bezeichnet wird und ein Gemisch von so genanntem A- und B-Crystallin darstellt. Bei diesem Protein hat sich ebenfalls gezeigt, dass eine gute Korrelation des Alters und des Gehaltes speziell der D-Asparaginsäure



Dr. rer. nat. Jochen Kirschbaum
Laboratory Manager, Analytical Services,
Medizintechnisches Zentrum,
Pauwelsstraße 19, 52074 Aachen
jochen.kirschbaum@ernaehrung.uni-giessen.de

Jochen Kirschbaum, Jahrgang 1966, Chemiestudium an der Universität Stuttgart, Promotion 1995 an der Universität Hohenheim zum Thema „Entwicklung und Anwendung von HPLC-Methoden mit chemischer Derivatisierung und selektiver Detektion zur Erfassung von Schadstoffen natürlicher Herkunft in Lebensmitteln“. Seit 1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bzw. Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Ernährungswissenschaft bei der Professur für Lebensmittelwissenschaften; Arbeitsbereich Instrumentelle Hochleistungsanalytik, Strukturaufklärung von Biomolekülen, Durchführung zahlreicher Industrieanalysen. Seit April 2007 als Laboratory Manager im Medizintechnischen Zentrum Aachen tätig.

gegeben ist, welches sich zeitabhängig aus der L-Asparaginsäure bildet. Dieser Befund konnte ebenfalls in Trübungen aufweisenden Augenlinsen (durch Bildung so genannter Katarakte) bestätigt werden. Diese Zunahme der D-Form ist im Tiermodell auch durch UV-Strahlung und radioaktive Strahlung zu erzielen. Nähere Untersuchungen ergaben während der Auftrennung der Crystalline des Augenlinsenproteins einer 80-jährigen Person, dass die Razemisierung der Asparaginsäure in Position 58 der Aminosäurekette ein D/L-Verhältnis von 3,1, dasjenige von Asparaginsäure in Position 115 von 5,7 ergab (Abb. 4b) (Fuji *et al.* 1984).

Untersuchungen am amyloiden β -Protein, eines aus 42 Aminosäuren bestehenden Peptids, welches in amyloiden Plaques im Gehirn von Alzheimer-Patienten gefunden wird, zeigten ebenfalls, dass die Asparaginsäure in Position 1 und 7 stark razemisiert ist, während dies für Asparaginsäure in Position 23 nicht der Fall ist (Abb. 4c). Die Änderung der Stereochemie der Asparaginsäure in bestimmten Positionen könnte demnach für die Strukturänderung und damit Aggregation verantwortlich sein. Dies zeigt bei gleicher

Zeitdauer zusätzlich eine positionsbedingte Razemisierungstendenz der Aminosäure im Proteinmolekül und lässt Rückschlüsse auf den Razemierungsmechanismus zu.

Konsequenterweise ergibt sich die Frage, wie stabil proteingebundene L-Aminosäuren überhaupt sind und – falls nicht – wie rasch der Übergang von der jeweiligen L-Form in die D-Form erfolgt. Die Bestimmung der Aminosäureenantiomeren erfordert zuverlässige analytische Methoden zur Trennung und Quantifizierung derselben. Diese Trennung ist schwierig, da sich Bild und Spiegelbild eines Moleküls in einer nicht-händigen (achiralen) Umgebung chemisch völlig gleich verhalten. Die von uns verwendete vorerwähnte analytische Methode steht erst seit den siebziger Jahren zur Verfügung. Aus zahlreichen durchgeführten Untersuchungen ergibt sich, dass L-Aminosäuren in Bezug auf ihre Chiralität nicht stabil, sondern einem langsamen, aber stetigen und unaufhaltsamen Übergang von der L-Form in die D-Form unterliegen. Dieser Übergang ist von der Zeit und der Temperatur abhängig und auch von der Art der Aminosäure und deren Position im Protein.

Aus chemischer Sicht entfernt sich ständig eine kleine Anzahl der an das tetraedrische C-Atom gebundenen H-Atome, wobei der ursprünglich als Tetraeder vorliegende Kohlenstoff kurzfristig in einen instabilen, planaren Übergangszustand wechselt. Das sich kurzfristig entfernte H-Atom oder ein anderes wird nach kurzer Zeit wieder gebunden. Dies geschieht von beiden Seiten mit etwa gleicher Wahrscheinlichkeit, so dass jeweils wieder stabile, tetraedrische Moleküle entstehen, die sich wiederum wie Bild und Spiegelbild verhalten. Man sagt, die ursprünglich vorliegende L-Aminosäure ist enantiomerisiert oder (mehr oder weniger) ‚razemisiert‘. Auch dies lässt sich leicht mit Hilfe der Abbildung 1 a nachvollziehen.

Aus dem zuvor erläuterten ergibt sich die generelle Frage, welcher oder welche Razemierungsmechanismen sich der Umwandlung von L-Asparaginsäure bzw. Asparagin in D-Asparaginsäure zugrunde legen lassen.

Aus Untersuchungen an Modellpeptiden und von isolierten natürlichen Sequenzen lässt sich zeigen, dass nachfolgender komplexer Sachverhalt vorliegt (Abb. 5). Dieser schließt nicht nur Razemierungs- sondern auch Cycli-

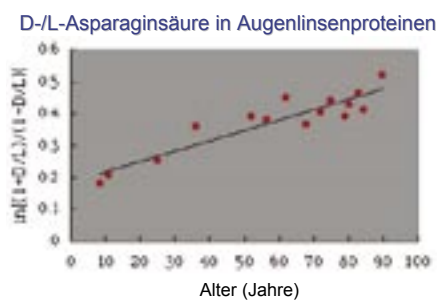
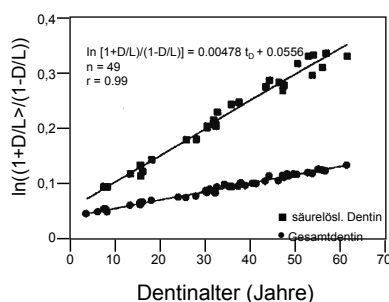


Abb. 4: Altersabhängige Razemisierung von Asparaginsäure in (a) Zahndentin, (b) Augenlinsenprotein und (c) in Amyloid β -Protein in Gewebe von Alzheimer Patienten. Dort sind Asparaginsäurereste (Asp, D) in Position 1 und 7, nicht jedoch in Position 23 isomerisiert und racemisiert (Ritz-Timme *et al.* 2002; Fujii *et al.* 1994).

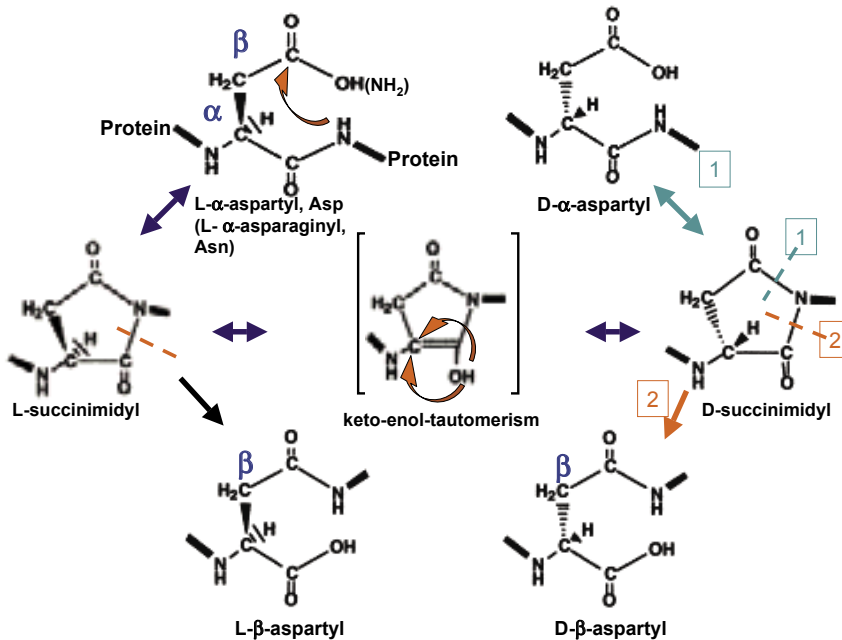


Abb. 5: (a) Formelschema der Umwandlung von Asparaginsäure oder Asparagin über Cyclisierungs-, Isomerisierungs- und Razemisierungsreaktionen.



Abb. 5: (b) Schematische Darstellung der Veränderungen der Molekülstruktur der Teilsequenz -Asp-Gly- eines Proteins, die sich daraus ergibt.

sierungs- und Isomerisierungsschritte mit ein, die bei der Diskussion der Strukturänderungen von Proteinen und den damit zusammenhängenden Alterungsprozessen mit berücksichtigt werden müssen. In Folge des intramolekularen Angriffs auf die L-Asparaginsäure durch die im Protein derselben nachfolgende Aminosäure, insbesondere Glycin, wird eine zyklische Struktur ausgebildet. Diese wird als Succinimid bezeichnet. Dieser Übergang von einer linearen in eine zyklische Struktur bewirkt eine drastische Veränderung der Struktur und damit der Funktionsfähigkeit des Proteins. Diese Ringstruktur ist reaktiv, und das darin enthaltene

asymmetrische C-Atom, welches ja identisch ist mit demjenigen der zugrunde liegenden L-Asparaginsäure, kann durch reversible Abspaltung eines H-Atoms ebenfalls sehr leicht enantiomerisieren, d.h. in die D-Form übergehen. Damit liegt aber wiederum ein verändertes Protein vor, das sich von der ursprünglichen Struktur bezüglich dieses C-Atoms unterscheidet.

Auch die intermediär gebildeten Ringstrukturen sind nicht besonders stabil und können durch Aufnahme von Wasser (Hydrolyse) an zwei Stellen gespalten werden. Bei Spaltung 1 entsteht wieder das ursprüngliche Protein, in welchem jedoch die ursprüngliche L-

Asparaginsäure (teilweise) razemisiert ist. Bei Spaltung 2 entsteht eine räumlich stark veränderte Proteinstruktur, da sich das Protein nicht linear in der so genannten α-Position fortsetzt, sondern durch Wanderung an die so genannte β-Position einen Knick bildet.

Diese räumliche Umlagerung wird als Isomerisierung oder chemisch korrekt als α→β-Transpeptidierung bezeichnet, da sich die Proteinkette von der α-Position in die β-Position der Asparaginsäure verschiebt. Diese dadurch erfolgende, dramatische strukturelle Veränderung lässt sich an einem Ausschnitt einer Proteinkette eindrücklich demonstrieren (Abb. 5 b). Auch in den durch diese Verschiebung gebildeten Stereoisomeren (räumlichen Isomeren) kann die sich ursprünglich in der L-Form befindliche Asparaginsäure durch die in der intermediär gebildeten zyklischen Succinimid-Form als D-Asparaginsäure vorliegen. Dieser komplizierte, in jedem langlebigen Protein jedoch ständig ablaufende Vorgang, ist in der Abbildung 5a dargestellt.

Da die Razemisierung anderer L-Aminosäuren langsamer verläuft als diejenige der L-Asparaginsäure, können die daraus zeitabhängig entstandenen entsprechenden D-Enantiomere auch zur Altersbestimmung organischer Proben langer Lagerdauer, z. B. in Fossilien, eingesetzt werden. Die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses ist durch die in der Abbildung 3 gezeigte Methode auch für diese Aminosäuren möglich.

Zusammenfassend sei festgehalten, dass in den metabolisch stabilen, langlebigen Proteinen aller Organismen unerbittlich die vorgestellten Cyclisierungs-, Isomerisierungs- und Razemisierungsvorgänge ablaufen, die nicht beeinflussbar sind und die zur Alterung von Proteinen führen. Am nur einmal gebildeten Dentin eines jeden von uns

nagt demnach buchstäblich auch der ‚Zahn der Zeit‘.

Es sei nochmals hervorgehoben, dass jede der in Abbildung 5 dargestellten Veränderungen wiederum von der jeweiligen räumlichen Struktur der einzelnen Proteine abhängt. Sie erfolgen zeit- und temperaturabhängig und sind zudem von der physiologischen Umgebung des Proteins beeinflusst.

Die am Beispiel der Veränderungen der Asparaginsäure aufgezeigten molekularen Prozesse und die damit zusammenhängenden funktionellen Veränderungen von Proteinen lassen sich prinzipiell auf alle Aminosäuren übertragen.

Grundlagen zur Untersuchung sind immer die Entwicklung und souveräne Anwendung entsprechend sensitiver und enantiomerenselektiver bioanalytischer Methoden. Neben dem hier dargestellten gaschromatographischen Verfahren wurden in unseren Laboratorien auch flüssigchromatographische Methoden höchster Trennleistung entwickelt. Basierend auf diesen Hochleistungs-Analysemethoden werden die Untersuchung der molekularen Spiegelwelten und die dadurch verursachten Strukturänderungen von Proteinen sicher noch manch Überraschendes über die damit zusammenhängenden degenerativen Veränderungen und Alterungsprozesse aller Lebewesen erbringen.

Es sei noch angemerkt, dass sich die Natur die Vorteile einer verborgenen, den üblichen biochemischen Stoffwechselfaden entzogenen, molekularen Spiegelwelt der Aminosäuren zunutze gemacht hat. Anwendung obiger Hochleistungsanalytik zeigte neue Razemisierungsmechanismen auf (Brückner *et al.*, 2001) und ergab, dass in allen Organismen – Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Tier und Mensch – meist kleine, aber signifikante Mengen von freien D-Aminosäuren enthalten sind (Pätzold *et al.*, 2005). Wirkungsweise und Relevanz derselben



Dr. rer. nat. Ralf Pätzold

Institut für Ernährungswissenschaft
Interdisziplinäres Forschungszentrum (IFZ)
Heinrich-Buff-Ring 26–32, 35392 Gießen
Telefon: 0641 99–39143
ralf.paetzold@ernaehrung.uni-giessen.de

Ralf Pätzold, Jahrgang 1965, Studium der Lebensmittelchemie in Braunschweig 1986–1990, erstes Staatsexamen 1990, zweites Staatsexamen 1991; 1991–1995 Promotionsarbeit im Fach Lebensmittelchemie zum Thema „Untersuchungen an Bier und Hopfen zum Deutschen Reinheitsgebot und zur Sortenunterscheidung mittels HPLC“. 1996–1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Ernährungswissenschaft, Professur für Ernährung des Menschen, an der Justus-Liebig-Universität Gießen. 1998–2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Biochemie und Endokrinologie der Universität Gießen, 2000–2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Ernährungswissenschaft, Professur für Lebensmittelwissenschaften. Seit 2005: Erster Vorsitzender des Regionalverbandes Süd-West der Lebensmittelchemischen Gesellschaft. Einreichung einer Habilitationsschrift zum Thema „Aminosäurerazemisierung“; seit 2006 Akademischer Rat im Institut für Ernährungswissenschaft, Professur für Lebensmittelwissenschaften.

sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung – auch in Gießen (Konno *et al.*, 2007).

LITERATUR

- Brückner H, Justus J, Kirschbaum J (2001) Saccharide induced racemization of amino acids in the course of the Maillard reaction. *Amino Acids*, 21: 429–433.
- Erbe T, Brückner H (1999) Microwave treatment of dietary gelatine does not generate cis-4-hydroxy-L-proline, an inhibitor of collagen biosynthesis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 208: 424–428.
- Fujii N, Satoh K, Harada K, Ishibashi, Y (1994) Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha A-crystallin from human lens. *J Biochem (Tokyo)*, 116: 663–669.
- Konno R, Brückner H, D'Aniello A, Fisher G, Fujii N, Homma H (Eds.) (2007) *D-Amino Acids. A New Frontier in Amino Acids and Protein Research. Practical Methods and Protocols*. Nova Science Publisher, New York.
- Pätzold R, Schieber A, Brückner H (2005) Gas chromatographic quantification of free D-Amino acids in higher vertebrates. *Biomedical Chromatography*, 19: 466–473.
- Ritz-Timme S, Rochholz G, Stammert R, Ritz H J (2002) Biochemische Altersschätzung. Zur Frage genetischer und soziokultureller (ethischer) Einflüsse auf die Razemisierung von Asparaginsäure in Dentin. *Rechtsmedizin*, 12: 203–206.