

II

Diss. ETH. Nr. 10299

**METABOLISMUS, AUSSCHÜTTUNG UND MÖGLICHE  
FUNKTIONEN VON SCHWEFELHALTIGEN AMINOSÄUREN  
UND PEPTIDEN IM NERVENSYSTEM DER RATTE**

**ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN**

der  
**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
in Zürich**

vorgelegt von  
**Leo Karl Zängerle  
Dipl. Chem. ETH  
geboren am 6. Mai 1963  
Bürger von Rorschacherberg (SG)**

angenommen auf Antrag von  
**Prof. Dr. K.H. Winterhalter, Referent  
Prof. Dr. M. Cuénod, Korreferent**

1993

## 5. ZUSAMMENFASSUNG DER DISSERTATION

### 5.1 ZUSAMMENFASSUNG

(a) Homocysteinsulfonsäure (HCA) könnte eine Rolle in der Neurotransmission spielen, da diese Verbindung im Nervengewebe (der Ratte) vorhanden ist (Cuénod et al.1992), neuroaktiv ist und in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Weise während einer  $\text{K}^+$ -Depolarisation aus Rattenhirnschnitten ausgeschüttet wird (Do et al.1986a). Die immunohistochemische, vorwiegend gliale Lokalisation von HCA spricht allerdings gegen eine Funktion als klassischer Neurotransmitter (Grandes et al.1991). Für das Verständnis der physiologischen Funktionen von HCA ist die Kenntnis sowohl der Biochemie wie auch der Zytanatomie des Metabolismus von grosser Bedeutung.

Über die Biosynthese von HCA ist in der Literatur wenig berichtet. Eine zum oxidativen Metabolismus von Cystein analoge Reaktionsfolge für Homocystein (HCys), die zu HCA führen würde, wurde postuliert (Do et al.1988). Um diese Hypothese zu prüfen, wurde in der vorliegenden Dissertation radioaktiv markiertes HCys mit Hilfe geeigneter Enzyme synthetisiert. Diese mögliche Vorstufe von HCA wurde (im tiefen mikromolaren Konzentrationsbereich), zusammen mit diversen Kofaktoren und Hemmstoffen, mit Rattenhirnhomogenat inkubiert. Aliquote davon wurden mittels geeigneter HPLC-Methoden analysiert.

Während eine beträchtliche Cysteindioxygenase-Aktivität beobachtet werden konnte, war die Umsetzung von HCys zu Homocysteinsulfinsäure (HCSA) sehr gering. HCA entstand in diesen Inkubationen nicht. Es wurde vermutet, dass nichtenzymatische Oxidationen zur Bildung von radioaktiv markiertem HCSA aus markiertem HCys führten. Dies konnte zwar nicht eindeutig bewiesen werden, aber folgende Resultate unterstützen diese Vermutung: (i) In Inkubationen von HCys im millimolaren Konzentrationsbereich mit Homogenat wurden während 6h weniger als 0.1% zu HCSA umgesetzt. (ii) Die Produktion von HCSA in solchen Inkubationen war unabhängig davon, ob *L*- oder *D*-HCys eingesetzt wurde. (iii) In Kontrollinkubationen ohne Homogenat konnten vergleichbare Umsatzraten (von HCys zu HCSA) festgestellt werden.

Da somit kein enzymatischer, oxidativer Metabolismus von HCys nachgewiesen werden konnte, wurde eine zweite Hypothese für die Biosynthese von HCA untersucht, nämlich ein möglicher oxidativer Metabolismus von S-Adenosyl-homocystein (SAH). Diese Verbindung könnte im Gewebe zum entsprechenden Sulfoxid oder/und Sulfon oxidiert werden. Ein Enzym wie die SAH-Hydrolase könnte in einer  $\beta$ -eliminativen Reaktion das Sulfoxid und/oder das Sulfon spalten, was zu oxidierten Formen von HCys führen sollte.

In einer Modellreaktion für eine solche Spaltung, (der Hydrolyse von S-Adenosyl-cysteinsulfoxid durch die  $\beta$ -Cystathionase) konnte gezeigt werden, dass dabei nicht nur die gewünschte Sulfonsäure, sondern auch das Disulfid, das Disulfidoxid und die Sulfinsäure entstanden. Wurde dieselbe enzymatische Spaltung unter reduktiven Bedingungen (1mM Dithiothreitol, DTT) durchgeführt, so entstand lediglich das Thiol. Alle Verbindungen konnten interpretiert werden als Folgeprodukte einer primär entstehenden, sehr instabilen Sulfensäure. Ferner wurde beobachtet, dass die SAH-Hydrolase (aus Kaninchenerythrozyten) unter reduktiven Bedingungen zwar das SAH-sulfoxid als Substrat akzeptierte, aber mit deutlich geringerer Affinität als SAH [ $K_M(\text{SAH-sulfoxid}) = 1.07\text{mM}$ ;  $K_M(\text{SAH}) = 63\mu\text{M}$  (Huxtable, 1986)]. Unter nichtreduktiven Inkubationsbedingungen (0mM DTT) wurde die SAH-Hydrolase durch SAH-sulfoxid irreversibel inhibiert, es handelte sich bei dieser Verbindung also um einen Selbstmordinhibitor für die SAH-Hydrolase. Diese verschiedenen Beobachtungen legten nahe, dass die Biosynthese von HCA nicht über das SAH-sulfoxid verläuft. Aufgrund von publizierten Arbeiten (z.B. Chiang et al.1977) konnte angenommen werden, dass das SAH-sulfon ebenfalls nicht in Frage kommt als Vorstufe für HCSA und HCA.

Die Bemühungen, den Anabolismus von HCA aufzuklären, blieben somit erfolglos. Dasselbe galt für Untersuchungen des Katabolismus. Möglicherweise bedarf der Metabolismus von HCA einer intakten Kompartimentierung, die durch Homogenisierung zerstört wird.

(b) Die Depolarisation einer präsynaptischen Nervenendigung durch elektrische oder chemische Stimuli bewirkt die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Exozytose von Neurotransmittern. Einige dieser endogenen neuroaktiven Verbindungen sind bekannt, so z.B. Glutamat, GABA, Glycin und Dopamin. Um neue potentielle Neurotransmitter zu finden, wurden Rattenhirnschnitte mit  $\text{K}^+$  (50mM) depolarisiert und die Superfusate analysiert. Mit der Verwendung der Monobrombiman- oder Jodacetat/OPA-Derivatisationsmethode, gekoppelt mit nachfolgender Umkehrphasen-HPLC und Fluoreszenzdetektion, wurde auf thiol- und disulfidhaltige Verbindungen fokussiert.

Mit einer Nachweisgrenze im tiefen pmol Bereich konnten in den Superfusaten von dieser Substanzklasse nur Glutathion (GSH) und Cystein (Cys) nachgewiesen werden. Eine statistisch signifikante Ausschüttung von GSH während der Depolarisation wurde entdeckt und die publizierte Ausschüttung von Cys qualitativ verifiziert (vgl. Keller et al. 1989). Insbesondere die Ausschüttung von GSH wurde genauer charakterisiert. 85-100% des freigesetzten GSH lagen in der Thiolform vor. Die Freisetzung aus Cortexschnitten unter Bedingungen, in denen das Nervengewebe nicht stimuliert wurde, betrug 2pmol/ mg Protein/ min. Dies war vergleichbar mit den Glutamat- und Aspartatkonzentrationen in denselben Proben. Die Erhöhung der totalen GSH-Konzentration (reduzierte und oxidierte Form) während der  $\text{K}^+$ -Depolarisation war in allen Hirnregionen signifikant und am grössten für den Cortex (3.1x der Basalefflux) und das Mesodiencephalon (2.8x), am tiefsten für das Cerebellum (1.8x). Ausser für das Cerebellum war diese  $\text{K}^+$ -induzierte Ausschüttung signifikant  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, was auf eine Funktion von GSH in der synaptischen Neurotransmission hinweist.

Bindungsstellen für Glutathion an synaptischen Membranen wurden bereits beschrieben (Ogita und Yoneda, 1987, 1988 und 1989). Interessanterweise sind die Bindungsaffinitäten im Bereich der gemessenen extrazellulären GSH-Konzentrationen. Weiter könnte GSH (und Cys) über Thiol/Disulfidaustauschreaktionen Rezeptoren und Kanäle der synaptischen Membranen kovalent modifizieren und dadurch modulieren. Z.B. für den NMDA-Rezeptor-Kanal ist Redox-Sensitivität bekannt (Aizenman et al. 1989).

Die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ist ein gut charakterisiertes Enzym, das für den transmembranären Transport von GSH (z.T.) verantwortlich ist. Wir fanden, dass Inhibitoren dieser Enzymaktivität keinen Einfluss auf die Konzentration von GSH in den Superfusaten hatten. Möglicherweise spielen andere Transporter eine Rolle bei der Aufnahme von GSH aus dem synaptischen Spalt (vgl. Kannan et al. 1992).

(c) Im Zusammenhang mit möglichen Funktionen von Glutathion und Cystein als Redox-Modulatoren von synaptischen Elementen wurde die Frage aktuell, ob Thiol/Disulfidgleichgewichte auf zellulärem und subzellulärem Niveau gemessen werden könnten. Die Anforderungen an einen entsprechenden Indikator wurden ausgearbeitet und es wurde vorgeschlagen, dass Bimanderivate geeignete Verbindungen sein könnten, um Thiol/Disulfid-Redoxpotentiale mit fluorometrischen Methoden zu messen.

Experimentell wurden Monobrombiman und Dibrombiman zum Thiol resp. Disulfid derivatisiert. Beide Verbindungen waren jedoch chemisch instabil und zerfielen teilweise schon während der Reinigung zu mehreren Folgeprodukten. Diese wurden mittels Mikro-HPLC-CF-FAB-MS strukturell aufgeklärt, so dass die Zerfallsmechanismen rationalisiert werden konnten. Es wurde klar, dass aus dieser Verbindungsklasse kein geeigneter Redox-Fluoreszenzindikator gewonnen werden kann.

## 5.2 SUMMARY

a) Homocysteinsulfonic acid (HCA) might play a role in synaptic neurotransmission, because this compound is (i) present in the nervous tissue of the rat (Cuénod et al.1992), (ii) neuroactive and (iii) released in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner during a  $\text{K}^{+}$ -induced depolarization from rat brain slices (Do et al.1986a). The immunohistochemical, predominantly glial localization of HCA, however, is not in accordance with a classical function as a neurotransmitter (Grandes et al.1991). For the understanding of the physiological function of HCA, the knowledge of the biochemistry and cytoanatomy of its metabolism is of great importance.

To date, there is only little reported about the biosynthesis of HCA. Corresponding enzymes were neither characterized nor isolated. In analogy to the oxidative metabolism of cysteine (Cys), a reaction sequence from homocysteine (HCys) to HCA was postulated (Do et al.1988). To test this hypotheses, we synthesized radioactively labeled homocysteine and incubated that potential precursor of HCA at low mikromolar concentrations, together with a set of cofactors and protease-inhibitors, in rat brain homogenate. Aliquots of the incubations were analyzed by appropriate HPLC-methods. Whereas a substantial cysteine-dioxygenase activity could always be detected, the formation of homocysteinsulfinic acid (HCSA) was very small (less than 1% of total radioactivity within 4 hours of incubation). HCA was not formed in the incubations. It was suggested, that nonenzymatic oxidations of radioactively labeled HCys leads to the observed HCSA. This was supported by the following results: (i) In incubations with mM amounts of HCys (in rat brain homogenates), less than 0.1% were oxidized to HCSA within 6 hours. (ii) The production of HCSA in such incubations was independent of the use of either *L*- or *D*-HCys. (iii) Similar production rates of HCSA were detected in control incubations without homogenate.

As there was no enzymatic, oxidative metabolism of HCys detected, a second hypothesis of the biosynthesis of HCA was tested. It was about a possible oxidative metabolism of S-adenosyl-homocysteine (SAH). This compound might be oxidized in the tissue to the corresponding sulfoxide and/or sulfone. An enzyme similar to the SAH-Hydroase could then cleave the sulfoxide or/and sulfone in a  $\beta$ -elimination, which would lead to oxidized forms of HCys.

In a model reaction for such a cleavage (the hydrolysis of S-adenosyl-cysteine, catalyzed by the  $\beta$ -cystathionase) it was shown that not only the desired sulfonic acid, but also the disulfide, the disulfide-oxide and the sulfinic acid was formed. If the same enzymatic cleavage was performed in a reducing solution (1mM dithiothreitol, DTT), the thiol was found to be the only product. All compounds were interpretable as secondary products of the primarily formed instable sulfenic acid.

Furthermore it was shown, that the SAH-hydrolase (from rabbit erythrocytes) accepted SAH-sulfoxide as a substrate, but with lower affinity than SAH [ $K_M(\text{SAH-sulfoxide}) = 1.07\text{mM}$ ;  $K_M(\text{SAH}) = 63\mu\text{M}$  (Huxtable, 1986)]. Under nonreducing incubation conditions (0mM DTT), the SAH-hydrolase was irreversibly inhibited bei SAH-sulfoxid. Therefore this compound acts as a suicide-inhibitor. On the basis of these observations it is suggested, that an oxidative metabolism of SAH to SAH-sulfoxide might not be responsible for HCA in the tissue. From the literature (e.g. Chiang et al.1977), SAH-sulfone could also be excluded to be the precursor of HCSA or/and HCA. Therefore, the elucidation of the anabolism of HCA was not successful.

The same was the case with the katabolism: whereas cysteinesulfinic acid (CSA) was degraded by rat brain homogenate very quickly, HCSA showed half live times of more than 10 hours, and HCSA was metabolically stable. There remains the possibility, that the metabolism of HCA requires specific compartmentation within intact cells (Cuénod et al. 1992).

b) Depolarization of a presynaptic nerve ending by electrical or chemical stimuli triggers the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis of neurotransmitters. Some of these endogenous neuroactive compounds are known, e.g. glutamate, GABA, glycine and dopamine. To find new potential neurotransmitters, rat brain slices were depolarized by 50mM  $\text{K}^+$ . The superfusates were screened for thiols and disulfides with the monobromobimane- or iodoacetic acid/OPA-derivatization methodology, combined with reversed phase-HPLC and fluorescence detection.

With a detection limit in the low pmol range, only glutathion (GSH) and cysteine (Cys) were detected in superfusates. A statistically significant release of GSH during the depolarization was found, and the already published release of Cys (Keller et al.1989) was qualitatively verified.

Especially the release of GSH was characterized in more detail. 85-100% of the released glutathione were in the reduced state. The basal efflux (under non-stimulating conditions) was 2pmol/mg protein/min. This was comparable with the concentrations of Glu and Asp in the same samples. The increase of the total GSH-concentration (reduced plus oxidized forms) during the  $\text{K}^+$ -induced depolarization was significant in all brain regions and the most prominent in the cortex (3.9 pmol/mg protein/min; 3.0-fold increase over resting efflux) and in the mesodiencephalon (4.0; 2.8-fold increase), and lowest in the cerebellum (2.2; 1.8-fold increase). Excluded the cerebellum, the  $\text{K}^+$ -induced release was significantly  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent. That points to a function of GSH in the synaptic neurotransmission.

Binding sites of GSH on synaptic membranes were already described (Ogita and Yoneda, 1987, 1988 and 1989). Interestingly, the binding affinities were in the range of the measured extracellular GSH-concentrations. Furthermore, GSH (and Cys) could modulate receptors or channels of the synaptic membrane by covalent modifications (thiol/disulfide-exchange reactions). E.g. for the NMDA-receptor/channel the redox-sensitivity is well known (Aizenman et al.1989).

The  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase is a well characterized enzyme, that is (partially) responsible for the transport of GSH across cell membranes. It was found in this work, that inhibitors of this enzymatic activity didn't influence the concentration of GSH in the superfusates. Possibly, other transporters might play a role in the uptake of GSH from the synaptic cleft (see e.g. Kannan et al.1992).

c) In the context of possible functions of GSH and Cys as redox-modulators of synaptic elements, the question of measuring thiol/disulfide-equilibria on the cellular and subcellular level became relevant. It was suggested, that derivatives of monobromobimane and dibromobimane might be useful indicators to measure thiol/disulfide-redox potentials with fluorometric methods.

Experimentally, monobromobimane and dibromobimane were derivatized to the thiol, respectively to the disulfide. However, both compounds turned out to be instable. They already decomposed during the HPLC-purification. The formed products were purified and analyzed by mikro-HPLC-continuous-flow-fast-atom-bombardment-mass-spectrometry (Mikro-HPLC-CF-FAB-MS) and the mechanism of decomposition was rationalized. It became clear, that this class of compounds is not useful as fluorescent redox-indicators.