

The glutathione thiyl radical

Doctoral Thesis

Author(s):

Hofstetter, Dustin René

Publication date:

2012

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007558395>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

DISS. ETH NO. 20252

THE GLUTATHIONE THIYL RADICAL

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Dustin René Hofstetter
Dipl. Chem. ETH

born on 21st December 1977

citizen of Steinhof (SO)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Willem H. Koppenol, examiner
Prof. Dr. Ive Hermans, co-examiner

2012

Kurzfassung

Glutathion (abgekürzt GSH) ist ein Stoff, der in vergleichsweise hohen Konzentrationen im menschlichen Körper vorkommt und ist deshalb wichtig. Es spielt eine wichtige Rolle bei Reaktionen, die das Redox-Gleichgewicht in der Zelle erhalten. Es wurde schon für Aminosäuren und andere Peptide gezeigt, dass Schwefelradikale intramolekular Wasserstoffatome von Kohlenstoff abstrahieren können. Um diesen Sachverhalt an Glutathion Schwefelradikalen (GS^\bullet) zu untersuchen wählten wir zwei Methoden aus: Pulsradiolyse kombiniert mit UV-Vis, welches eine sehr hohe Zeitauflösung bietet, dafür aber eher wenig strukturelle Information, und NMR-Spektroskopie, welche zwar eine sehr detaillierte räumliche Auflösung hat, aber keine saubere, eher direkte Produktion der gewünschten Radikale erlaubt.

Reduziert man oxidiertes Glutathion (GSSG) mit hydrierten Elektronen und Wasserstoffatomen aus einer Pulsradiolyse, so ist die Umwandlung in das Glutathion Radikalanion ($\text{GSSG}^{\bullet-}$) quantitativ. Dieses Radikalanion dissoziiert zu Glutathion Schwefelradikalen und Glutathion Thiolat (GS^-), und das dabei entstandene Schwefelradikal abstrahiert intramolekular Wasserstoffatome. Wir beobachten eine sequentielle Entwicklung von UV-Absorptionssignalen, die auf die Bildung von sowohl α - und auch β -Kohlenstoffradikalen hinweist. Aus den Experimenten bei pH 2 und pH 11.8 wurden die Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- und die Rückreaktion des Gesamtgleichgewichts zwischen Schwefel- und Kohlenstoffradikalen bestimmt: $k_{\rightarrow} = 3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\leftarrow} = 7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, und $K = 0.4$. Des Weiteren konnte mit Hilfe der Differenzen der Spuren bei 240 nm und bei 280 nm ermittelt werden, dass das Verhältnis von α - zu β -Kohlenstoffradikalen überraschenderweise 1:3 ist. Die Bildung solcher Radikale kann zu irreversiblen Schaden an den Proteinen führen, da sich Bindungen zwischen Kohlenstoff-Atomen bilden können oder die Peptidhauptkette fragmentieren kann.

NMR-Experimente mit AAPH als Radikalinitiator und Propan-2-ol und Phenylmethanol als Radikalketten-Verlängerer wurden benutzt um RS^\bullet aus cysteinhaltigen Peptiden RSH zu erzeugen. Mehrere gekoppelte Gleichgewichte führen dazu, dass an Kohlenstoff gebundenes Protium durch Deuterium ausgetauscht werden kann. Die Resultate schränken die möglichen Orte zwar ein, lassen keinen eindeutigen Schluss zu, wo der Austausch stattfindet. Man erkennt dennoch, dass die Struktur und die Ionisation (pH-Wert) einen starken Einfluss auf die Ergebnisse haben. Die einzige Tendenz, die sich ausmachen lässt, ist die Verstärkung des D/H-Austausches wenn Stickstoffatome (oder ein freies Elektronenpaar) in der Nähe des Thiylradikals vorhanden sind. Die NMR-Experimente zeigen auch, dass Glutathion in saurer Umgebung umlagert, die vorgeschlagene Struktur eines Thiolactons passt zu den erhaltenen Daten und Reaktionsbedingungen.

Thiylradikale können eine Quelle für *S*-Nitrosoglutathion sein, da im selben Kompartiment ebenfalls freies NO^\bullet vorkommt und eine simple Radikalkombination das Produkt bilden würde. Experimente mit Laser Flash Photolyse ergaben, dass die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion des Glutathion-Thiylradikals mit NO^\bullet kleiner sein muss als $2.8 \pm 0.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Umwandlung des Schwefelradikals zum Kohlenstoffradikal bei 10^3 s^{-1} ist schneller als die Bildung von *S*-Nitrosoglutathion, wenn man physiologische Konzentrationen von Stickstoffmonoxid voraussetzt. Es muss also andere Entstehungswege geben, die effizienter sind und damit auch relevanter.

Thiylradikale haben ein breites Spektrum an Reaktionsmöglichkeiten welche von Struktur und Umgebung, z.B. dem pH-Wert, abhängen. Wir zeigen hier, dass ihre Reaktion oft unvorhersehbar und kontraintuitiv ist. Nichtsdestotrotz haben sie ein grosses Alterungspotential und deshalb ist es wichtig, ihre Reaktivität zu verstehen.

Résumé

Le glutathion est un composé dont le corps possède une concentration assez haute comparé à d'autres constituants, et cela le rend important en vue des processus cellulaires. Ce composé joue un rôle très important pour les réactions responsables de la gestion de l'équilibre redox dans la cellule. La possibilité d'enlèvement d'atomes d'hydrogène par des radicaux de soufre (GS^\bullet) fût découverte déjà pour des acides aminés et d'autres peptides. Pour investiguer si ces réactions sont aussi possibles pour le glutathion, nous choisîmes deux méthodes : la radiolyse pulsée en combinaison avec UV-Vis, qui a une résolution temporelle très grande mais qui apporte seulement peu d'information sur la structure de l'espèce observée, et la spectroscopie RMN, qui donne une résolution spatiale très fine mais manque d'une méthode nette de production des radicaux souhaités.

La réduction de glutathion oxydé GSSG à son ion radical $\text{GSSG}^{\bullet-}$ avec des électrons hydratés et des atomes d'hydrogène produit par une radiolyse pulsée se déroule quantitativement. Cet ion radical se désintègre en radicaux de soufre et le thiolate de glutathion (GS^-). Le radical de soufre qui se forme dans ce processus est capable d'enlever des atomes d'hydrogène dans la même molécule. Nous observons une séquence de signaux d'absorption dans l'UV qui indique la formation de radicaux de carbone en positions α et β . Les expériences à pH 2 et pH 11.8 permirent la détermination des constantes de vitesse de la réaction progresse ($3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$), de la réaction régresse ($7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$) et la constante de l'équilibre ($K = 0.4$). En plus, les différences entre les évolutions temporelles de l'absorption à 240 nm et 280 nm indiquèrent que le rapport entre les radicaux de carbone en positions α et β est 1 : 3, ce qui est très surprenant. La formation de tels radicaux peut mener à la formation de liaisons carbone-carbone ou à la fragmentation de la chaîne principale des peptides et ainsi contribuer à des dégâts irréversibles auprès des protéines.

Dans les expériences RMN (résonance magnétique nucléaire) des peptides contenant de la cystéine sont transformés en radicaux de soufre avec AAPH comme source de radicaux et alcool isopropylique ou alcool benzylique comme agents transporteurs des radicaux. Dans de telles expériences des atomes de protium liés à des atomes de carbone peuvent être échangés par des atomes de deutérium à cause de plusieurs équilibres interdépendants. Les résultats ne permettent pas de localisation exacte des sites d'échange, mais il est évident que la structure et l'ionisation (valeur pH) influencent fortement les résultats. L'amplification de l'échange en présence d'atomes d'azote (ou des doublets non liants) est la seule tendance qui se manifeste. Le site préférentiel d'échange de glutathion est celui de la glutamine β et γ à pH 2 et cystéine α à pH 7. Les expériences montrent aussi que glutathion se transforme très lentement en solution légèrement acide (pH 3), la suggestion de structure est en accord avec les données obtenues et les conditions de réaction.

Les radicaux de soufre peuvent être une source pour *S*-nitrosoglutathion, parce qu'il y a du monoxyde d'azote NO^\bullet dans le même compartiment cellulaire. Des expériences de photolyse « flash » de laser produisirent une limite supérieure pour la constante de vitesse de la réaction entre le radical de soufre de glutathion et le monoxyde d'azote : $2.8 \pm 0.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Si on tient compte de la concentration physiologique de NO^\bullet , la transformation du radical de soufre en radical de carbone est plus rapide (10^3 s^{-1}) alors, il y a des chemins de formation qui sont plus efficaces et, plus relevant.

Le Destin des radicaux de soufre est déterminé par une grande pluralité de possibles réactions et il est dépendent de leur structure et de l'environnement. Dans cette thèse je démontre que le comportement de ces radicaux est souvent imprévisible et contre l'intuition. Tout de même, ils ont un grand potentiel de vieillissement et c'est pourquoi il est impératif de comprendre leur réactivité.

Summary

Glutathione is an abundant and thus important compound in the human body. It is involved in reactions that maintain the redox state of a cell. It has been shown for other peptides with thiol groups, that their sulfur-centred radicals abstract hydrogen atoms intramolecularly from carbon atoms. In order to investigate the behaviour of glutathione thiyl radicals in this respect two methods were chosen: pulse radiolysis combined with UV-Vis, which allows to have a very good time resolution but limited structural information, and NMR spectroscopy, which yields a very detailed structural information but deprives of a clean and rather direct radical generation method.

The reduction of glutathione disulfide GSSG by hydrated electrons and hydrogen atoms from pulse radiolysis to form $\text{GSSG}^{\cdot-}$ is quantitative. This radical anion dissociates into GS^{\cdot} and GS^- , and the S-centred radical subsequently abstracts a hydrogen intramolecularly. We observe sequential development of UV absorbance signatures that indicate the formation of both α - and β -carbon-centred radicals. From experiments performed at pH 2 and pH 11.8, we determined forward and reverse rate constants for the overall equilibrium between sulfur-centred and carbon-centred radicals: $k_{\rightarrow} = 3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ and $k_{\leftarrow} = 7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, and $K = 0.4$. Furthermore, based on the differences between the kinetics traces at 240 nm and 280 nm, we estimate that α - and β -carbon-centred radicals are formed at a surprising ratio of 1:3. The formation of such radicals could lead to irreversible damage in proteins via formation of carbon-carbon bonds or backbone fragmentation.

NMR experiments with AAPH as a radical initiator and propan-2-ol and phenylmethanol as radical propagators generated RS^{\cdot} from cysteine containing peptides RSH. Several coupled equilibria lead to exchange of protium atoms bound to carbon atoms by deuterium atoms. The results do not allow concluding on a predictable exchange pattern, rather structure and ionization

(pH values) have a strong influence on the results. The only feasible tendency is the enhancement of D-/H-exchange in the presence of nitrogen (or a lone electron pair) in a proximal position to the thiyl radical. In particular, glutathione exchanges at pH 2 mostly at the glutamine β and γ positions, at pH 7 rather and strongly at the Cys α position. Phenylalanyl-cysteinyl-glycine exchanges at pH 2 the more the closer the hydrogen atom is to the sulfur atom, but Histidyl-cysteinyl-glycine shows a pronounced increase in exchange at the His residue proximal to the nitrogen atom. NMR experiments also revealed a re-arrangement of glutathione in acidic media, the suggested structure of a thiolactone fits the experimental data and reaction conditions.

Thiyl radicals could be a source of *S*-nitrosoglutathione as there could be free NO^\bullet present in the same compartment and a simple radical combination would lead to this product. Laser flash-photolysis experiments shows that the rate constant for the reaction of the glutathione thiyl radical with oxidodinitrogen(\bullet) to give *S*-nitrosoglutathione is lower than $2.8 \pm 0.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The conversion of the thiyl radical to its carbon-centred form at 10^3 s^{-1} exceeds the formation of *S*-nitrosoglutathione when physiological concentrations of oxidodinitrogen(\bullet) are taken into account. Other pathways must be more efficient and thus more relevant.

Thiyl radicals show a wide variety of possible reactions depending on structure and environment, e.g. the pH-value. Here we show that their reactions are often not predictable and counter-intuitive, nevertheless they have a high potential as a cause of ageing and therefore it is important to understand their reactivity.