



Doctoral Thesis

To Heed in Experiments with Peroxynitrite: Disproportionation to Nitrite and Peroxynitrate Catalyzed by Compounds with an N+-C-C-O Substructure, and One-Electron Oxidation Mediated by Edta Complexes of Fe(2+), Co(2+) and Ni(2+)

Author(s):

Molina, Christian

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-22396> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 22396

To Heed in Experiments with Peroxynitrite: Disproportionation to Nitrite and Peroxynitrate Catalyzed by Compounds with an N⁺-C-C-O Substructure, and One-Electron Oxidation Mediated by Edta Complexes of Fe(2+), Co(2+) and Ni(2+)

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH ZURICH)

presented by

CHRISTIAN MOLINA

M. Sc. ETH

born on 5.11.1980

citizen of Bauma ZH

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. W. H. Koppenol, examiner
Prof. Dr. A. Togni, co-examiner

2014

Summary

Peroxynitrite, ONOO^- and its conjugate acid ONOOH with $\text{p}K_{\text{a}} = 6.5\text{--}7.3$, is formed from NO^\bullet and $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Blough and Zafiriou 1985) in an extraordinary fast reaction with $k = 1.6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Nauser and Koppenol 2002, Botti et al. 2010). It can occur at μM concentrations *in vivo* (Beckman et al. 1990) when both NO^\bullet and $\text{O}_2^{\bullet-}$ are released simultaneously by activated macrophages or neutrophils (Green et al. 1979, Gryglewski et al. 1986, Hibbs et al. 1988, Moncada et al. 1988, McCall et al. 1989, Xia et al. 1996). Its occurrence accompanies inflammatory diseases (Pacher et al. 2007), and it triggers cell death at elevated concentrations, most probably because it is a powerful oxidant and nitrating agent. In biochemical tests, peroxynitrite is induced at μM to mM concentrations as a prototype agent for oxidative stress, against which the resistance or the protection of biomolecules is tested. These tests are usually carried out at a specific pH by use of various buffers: e.g. phosphate or tris(hydroxymethyl)aminomethane ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, Tris).

In this study, we confirmed that a 2nd-order process, which generates the artificial oxidant peroxynitrate, contributes significantly to the decay kinetics of peroxynitrite at neutral pH and high peroxynitrite concentration. Moreover, we discovered that two important tacit assumptions in experimental practice with peroxynitrite are flawed: 1) that buffers are inert towards peroxynitrite, and 2) that addition of edta keeps transition metal ions inert towards ONOO^- . We find that compounds with an $\text{N}^+\text{-C-C-O}$ substructure accelerate the 2nd-order disproportionation of peroxynitrite significantly. This finding is of great significance due to the widespread occurrence of the substructure $\text{N}^+\text{-C-C-O}$ among pH buffers (e.g. Tris, Tricine, TES, TAPS, TAPSO, Bicine, HEPES, HEPPS, MES, MOPS and

ACES) as well as biomolecules (e.g. amino acids, phospholipids, sphingolipids, choline and glucosamine). We find that in the presence of an excess of edta Fe^{II} , Co^{II} and Ni^{II} do react with ONOO^- , and these rapid reactions produce a powerful one-electron oxidant. To avoid perturbation of biochemical tests with peroxynitrite by the effects we found, we strongly recommend to use strictly metal-free peroxynitrite preparations and solutions, and to use only phosphate as pH buffer. In test samples with peptides or cell membranes, which contain phospholipids, the peroxynitrite concentrations should be kept well below $30 \mu\text{M}$ to keep the 2nd-order disproportionation negligible.

We studied the decay of peroxynitrite at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and $I = 0.2 \text{ M}$ by observing the absorption of ONOO^- at 302 nm by use of stopped-flow spectrophotometry. Within the physiologically important pH range of 6-8 in 70 mM phosphate, the decay trace of peroxynitrite is best fit by a model that takes into account three processes: the isomerization of ONOOH to HNO_3 (1st-order in peroxynitrite, $k_{\text{isomerization}} = 1.11 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$, this work), the disproportionation of ONOOH with ONOO^- to NO_2^- and O_2NOO^- (2nd-order in peroxynitrite, $k_{\text{disproportionation}} = (1.3 \pm 0.1) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, this work), and the decomposition of O_2NOO^- to NO_2^- and O_2 ($k = 1.35 \text{ s}^{-1}$, Goldstein et al. 1998). Tests with various concentrations of peroxynitrite and of the important buffer Tris at $\text{pH} = 6.8$ revealed that the first half-life of the decay trace of peroxynitrite correlates to $[\text{Tris}] \cdot ([\text{ONOO}^-] + [\text{ONOOH}])^2$: if this function of the initial concentrations exceeds $6.3 \cdot 10^{-12} \text{ M}^3$, Tris significantly speeds up the decay of peroxynitrite by acceleration of processes that are 1st-order and 2nd-order in peroxynitrite. We examined the decomposition of peroxynitrite in the presence (0.1 M) of various structural analogues of Tris: $^t\text{BuNH}_2$, $\text{MeC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, $^t\text{BuNH}_2 +$

MeC(CH₂OH)₃, NH₂CH₂CH₂OH, Me₃N⁺CH₂CH₂OH, NH₂CH₂CH₂OMe, NH₂CH₂CH₂OPO(OH)₂, NH₂CH(CH₂OH)COOH and NH₂CH₂COOH. All compounds that accelerate the 2nd-order disproportionation (up to the 7-fold) carry an N⁺-C-C-O substructure. However, this 2nd-order process is inhibited in the presence of the alcohol MeC(CH₂OH)₃, the amine ^tBuNH₂ or a mixture of both. Most likely, the cationic nitrogen of the N⁺-C-C-O substructure forms an ion pair with ONOO⁻ while the vicinal oxygen forms a hydrogen bond with ONOOH. Coordinated to the same molecule, ONOO⁻ and ONOOH react with each other under release of NO₂⁻ and O₂NOO⁻. This catalysis may be competitively inhibited by other anions, which instead of ONOO⁻ form an ion pair. With Tris buffer, the decay of peroxyntirite is indeed slowed down with increasing phosphate concentration. Product analysis revealed that the O₂-yield measured is twice as high as the one calculated for the decomposition in pure phosphate buffer, but surprisingly it is zero in Tris buffer, where the precursor of O₂, O₂NOO⁻, has been found in high yield (Gupta et al. 2009). In O₂-saturated Tris buffer, O₂ is neither released nor consumed. Thus, the O₂ that may origin from peroxyntirite would have to be scavenged exclusively. However, only a few percents of this O₂ have been proved to be singlet O₂ (Miyamoto et al. 2009). Thus, most probably O₂NOO⁻ is directly scavenged by reaction with the Tris base.

Tests with luminol, a quantitative chemiluminescent indicator specific for one-electron oxidants, revealed that in the presence of a 5-fold excess of edta over the metal, at pH = 12, the reactions of Fe^{II}, Co^{II} or Ni^{II} with ONOO⁻ all produce a potent one-electron oxidant. Mn^{II}, Cu^{II}, Zn^{II} and metal-free edta do not produce this effect. Catalysis by Co^{II} or Ni^{II} was not found. The edta complex of Fe^{III} is capable of oxidizing luminol.

Zusammenfassung

Peroxynitrit (ONOO^- und seine konjugierte Säure ONOOH mit $\text{p}K_s = 6.5\text{--}7.3$) entsteht durch die aussergewöhnlich schnelle Reaktion ($k = 1.6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Nauser and Koppenol 2002, Botti et al. 2010) von NO^\bullet mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Blough and Zafiriou 1985). Im menschlichen Körper kann es in mikromolaren Konzentrationen gebildet werden (Beckman et al. 1990), wenn aktivierte Makrophagen oder Neutrophile gleichzeitig NO^\bullet und $\text{O}_2^{\bullet-}$ produzieren (Green et al. 1979, Gryglewski et al. 1986, Hibbs et al. 1988, Moncada et al. 1988, McCall et al. 1989, Xia et al. 1996). Peroxynitrit tritt bei Entzündungen auf (Pacher et al. 2007) und löst in hohen Konzentrationen Zelltod aus; vermutlich weil es nitrierend und stark oxidierend wirkt. In der Biochemie wird es in mikromolaren bis millimolaren Konzentrationen als natürliches Oxidationsmittel eingesetzt um in Proben mit biologischen Substanzen oder lebenden Zellen oxidativen Stress zu simulieren. Üblicherweise wird in solchen Proben der pH mittels Puffern auf einen bestimmten Wert eingestellt: z.B. mittels Phosphat oder Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris).

Unsere Studien bestätigten, dass eine Reaktion 2. Ordnung in Peroxynitrit, die das künstliche Oxidationsmittel Peroxynitrat produziert, zur Zerfallskinetik von Peroxynitrit bei neutralem pH und hoher Peroxynitrit-Konzentration bedeutend beiträgt. Darüber hinaus deckten wir auf, dass zwei wichtige Annahmen im üblichen experimentellen Umgang mit Peroxynitrit falsch sind: erstens, dass pH-Puffer gegenüber Peroxynitrit inert seien und zweitens, dass Übergangsmetallionen durch Zugabe von edta gegenüber ONOO^- passiviert würden. Wir fanden, dass Verbindungen mit der Substruktur $\text{N}^+\text{-C-C-O}$ den Zerfall 2. Ordnung in Peroxynitrit signifikant beschleunigen. Die grosse Bedeutung dieser Erkenntnis spiegelt sich im

weit verbreiteten Vorkommen dieser Substruktur unter pH-Puffern (z.B. Tris, Tricin, TES, TAPS, TAPSO, Bicin, HEPES, HEPPS, MES, MOPS und ACES) sowie unter Biomolekülen (z.B. Aminocarbonsäuren, Phospholipide, Sphingolipide, Cholin und Glucosamin) wieder. Wir fanden auch, dass Fe^{II} , Co^{II} sowie Ni^{II} in Gegenwart eines Überschusses an edta mit ONOO^- reagieren und dabei starke Ein-Elektron-Oxidationsmittel erzeugen. Um zu vermeiden, dass die hier gefundenen Effekte in Experimenten mit Peroxynitrit Störungen hervorrufen, empfehlen wir die Verwendung von Phosphat als pH-Puffer sowie von strikt metallfreien Peroxynitrit-Präparaten und Lösungen. In Experimenten mit Peptiden oder mit Zellmembranen, welche Phospholipide enthalten, sollte eine Peroxynitrit-Konzentration von $30 \mu\text{M}$ nicht überschritten werden, damit die Freisetzung von Peroxynitrat vernachlässigbar bleibt.

Wir studierten den Zerfall von Peroxynitrit bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und 0.2 M Ionenstärke durch Beobachtung der Absorption von ONOO^- bei 302 nm mittels Stopped-flow-Spektrophotometrie. Im physiologisch relevanten pH-Bereich 6-8 in 70 mM Phosphat-Puffer wird die Zerfallskinetik von Peroxynitrit am präzisesten durch ein Modell beschrieben, welches drei Reaktionen berücksichtigt: die Isomerisierung von ONOOH zu HNO_3 (1. Ordnung in Peroxynitrit, $k_{\text{Isomerisierung}} = 1.11 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$, diese Arbeit), die Disproportionierung von ONOOH mit ONOO^- zu NO_2^- und O_2NOO^- (2. Ordnung in Peroxynitrit, $k_{\text{Disproportionierung}} = (1.3 \pm 0.1) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, diese Arbeit), und der Zerfall von O_2NOO^- zu NO_2^- and O_2 ($k = 1.35 \text{ s}^{-1}$, Goldstein et al. 1998). Die Variation der Konzentrationen von Peroxynitrit und von der viel benutzten Puffersubstanz Tris ergab, dass die erste Halbwertszeit der Absorption von Peroxynitrit mit der Funktion $[\text{Tris}] \cdot ([\text{ONOO}^-] + [\text{ONOOH}])^2$ korreliert. Übersteigt diese Funktion der Anfangskonzentrationen den Wert $6.3 \cdot 10^{-12} \text{ M}^3$, zerfällt Peroxynitrit

signifikant schneller; bei erhöhten Zerfallsraten sowohl 1. als auch 2. Ordnung in Peroxynitrit. Wir untersuchten den Zerfall von Peroxynitrit in Gegenwart (0.1 M) verschiedener struktureller Analoga von Tris: $t\text{BuNH}_2$, $\text{MeC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, $t\text{BuNH}_2 + \text{MeC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{Me}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OMe}$, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{COOH}$ und $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$. Alle untersuchten Substanzen, welche den Zerfall 2. Ordnung von Peroxynitrit (bis zum 7-fachen) beschleunigen, enthalten als gemeinsames strukturelles Element eine $\text{N}^+\text{-C-C-O}$ -Kette. Der Zerfall 2. Ordnung wird aber durch den Alkohol $\text{MeC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, durch das Amin $t\text{BuNH}_2$ sowie durch die Mischung dieser beiden inhibiert. In reinem Phosphat-Puffer ist die O_2 -Ausbeute doppelt so hoch wie anhand der oben ermittelten Parameter $k_{\text{Isomerisierung}}$ und $k_{\text{Disproportionierung}}$ berechnet. In Tris-Puffer konnte überraschenderweise keine O_2 -Entwicklung festgestellt werden, obwohl in Tris-Puffer die Vorläufersubstanz von O_2 , O_2NOO^- , in hohen Ausbeuten gefunden wurde (Gupta et al. 2009). In O_2 -gesättigtem Tris-Puffer wurde O_2 weder freigesetzt noch verbraucht. Also müsste das durch Zerfall von O_2NOO^- freigesetzte O_2 selektiv abgefangen worden sein. Jedoch werden nur wenige Prozent dieses O_2 im reaktiven Singulett-Zustand freigesetzt (Miyamoto et al. 2009). Also muss O_2NOO^- selbst abgefangen werden; möglicherweise durch die Tris-Base.

Experimente mit Luminol, einem chemilumineszenten Indikator für Ein-Elektronen-Oxidationsmittel, zeigten, dass Fe^{II} , Co^{II} sowie Ni^{II} in Gegenwart eines 5-fachen Überschusses an edta mit ONOO^- reagieren und, dabei starke Ein-Elektron-Oxidationsmittel erzeugen. Mn^{II} , Cu^{II} , Zn^{II} sowie metallfreies edta lösen in Gegenwart von ONOO^- die Chemilumineszenz-Reaktion von Luminol nicht aus; Fe^{III} aber schon ohne ONOO^- .