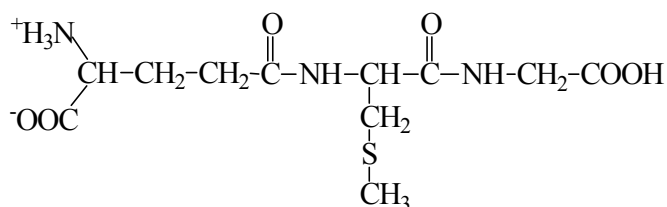


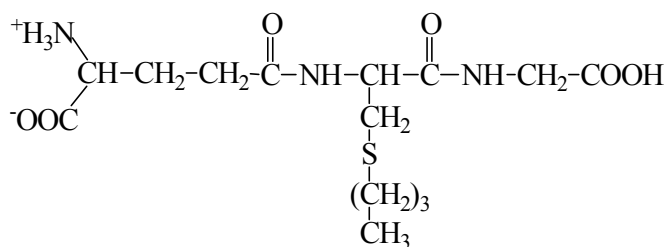
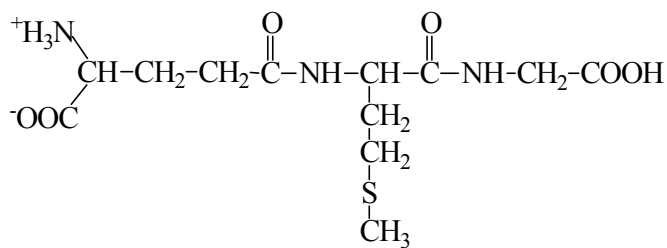
4.2.5. S-alkilowe pochodne glutationu i γ -glutamyl-metionyl-glicyna

Badane związki



S-metyloglutation

[Glu(Cys(Me)Gly)]

S-*n*-butyloglutation[Glu(Cys(*n*Bu)Gly)] γ -glutamyl-metionyl-glicyna [Glu(MetGly)]

Taki dobór związków modelowych umożliwił:

- (i) zbadanie na ile zaproponowane mechanizmy wyjaśniające procesy rodnikowe zachodzące w pojedynczych aminokwasach mogą wyjaśnić procesy rodnikowe zachodzące w prostych oligopeptydach zawierających grupę tioeterową;
- (ii) zbadanie roli wiązań peptydowych w cząsteczce i ich wpływu na charakter tworzących się indywiduów przejściowych;
- (iii) zbadanie roli podstawnika alkilowego w grupie tioeterowej ($-\text{CH}_3$, $-\text{nC}_4\text{H}_9$) oraz wpływu długości bocznego łańcucha alkilowego w jednostce aminokwasu

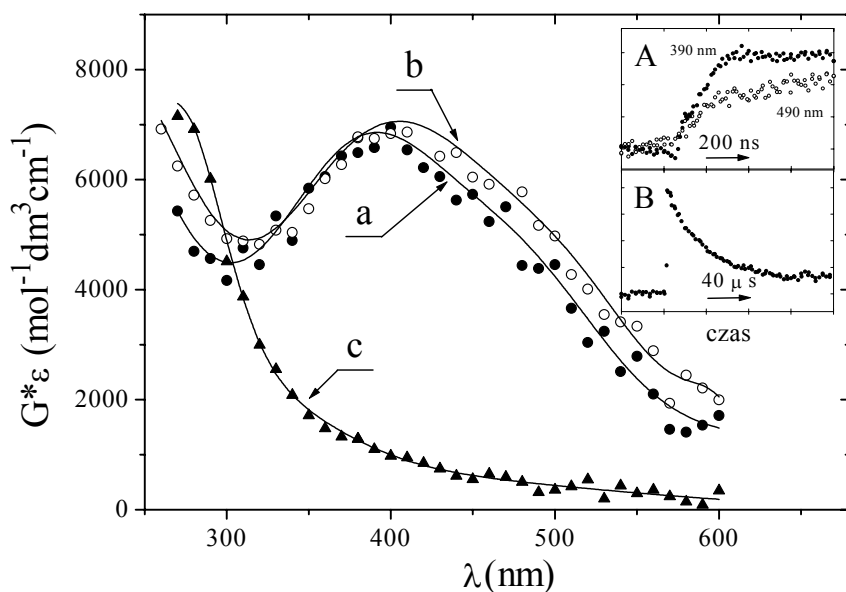
tioeterowego (S-metylocysteina, metionina) na charakter tworzących się indywidów przejściowych;

(iv) określenie w jakim stopniu położenie grupy tioeterowej w peptydach, gdy jest oddzielona od końcowych grup funkcyjnych (aminowej i karboksylowej), wpłynie na kierunek reakcji rodnikowych.

4.2.5.1. Wyniki badań i ich omówienie

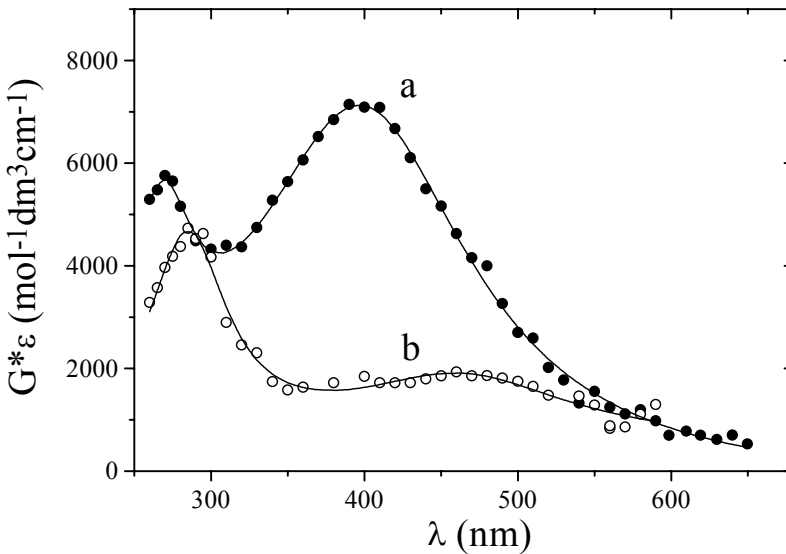
Radioliza impulsowa

S-metyloglutation (Glu(Cys(Me)Gly)): W środowisku silnie kwaśnym (pH 1) reakcja rodników OH w roztworach z Glu(Cys(Me)Gly) o stężeniu $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} prowadzi w skali czasowej kilkuset nanosekund do powstania szerokiego pasma absorpcji z $\lambda_{\text{max}} = 390$ nm z wyraźnie wykształconym ramieniem od strony długofalowej w okolicach 480 nm (rysunek 4.2.5_1 krzywa a). Ramię to jeszcze wyraźniej ulega wykształceniu w skali pojedynczych mikrosekund (rysunek 4.2.5_1 krzywa b) oraz w miarę podwyższania stężenia Glu(Cys(Me)Gly).



Rys. 4.2.5_1 Widma absorpcyjne produktów przejściowych 10^{-3} mol dm^{-3} roztworów Glu(Cys(Me)Gly) nasyconych N_2O , w pH 1 500 ns (a), 1,3 μs (b) 150 μs po impulsie (c). Wstawka A - kinetyki powstawania pasm absorpcji zarejestrowane w $\lambda = 390$ nm (●) i 480 nm (○). Wstawka B - kinetyka zaniku pasma absorpcji zarejestrowana w $\lambda = 390$ nm.

Sugeruje to wyraźnie powstawanie dwóch indywiduów przejściowych, co znajduje dodatkowe potwierdzenie w obserwacji kinetyk powstawania pasma absorpcji zarejestrowanych w dwóch długościach fali $\lambda = 390$ nm i 480 nm (wstawka A w rysunku 4.2.5_1). Podobnie jak dla większości badanych związków tioeterowych pasmo absorpcyjne w obszarze 450 - 500 nm zostało przypisane kationorodnikowi dimerowemu z międzycząsteczkowym wiązaniem S...S. Z kolei pasmo absorpcji z $\lambda_{\max} = 390$ nm może zostać przypisane zarówno kationorodnikowi z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S...O jak i S...N. Kinetyka zaniku absorpcji zarejestrowana w $\lambda = 390$ nm w skali czasowej dziesiątek mikrosekund (wstawka B w rysunku 4.2.5_1) wskazuje wyraźnie (opierając się na wcześniejszych obserwacjach czasów życia tego typu indywiduów (Bobrowski *i in.* 1993, Asmus *i in.* 1985, Schöneich *i in.* 1994)), że powstającym drugim indywiduum jest najprawdopodobniej kationorodnik z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S...O, z udziałem atomu tlenu z wiązania peptydowego (patrz - dyskusja wyników). Widmo absorpcji zarejestrowane w pH 1 dla niskiego stężenia Glu(Cys(Me)Gly) ($2 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) (rysunek 4.2.5_2, krzywa a) jest znacznie węższe i charakteryzuje się wyraźnie wykształconym maksimum absorpcji z $\lambda_{\max} = 390$ nm.

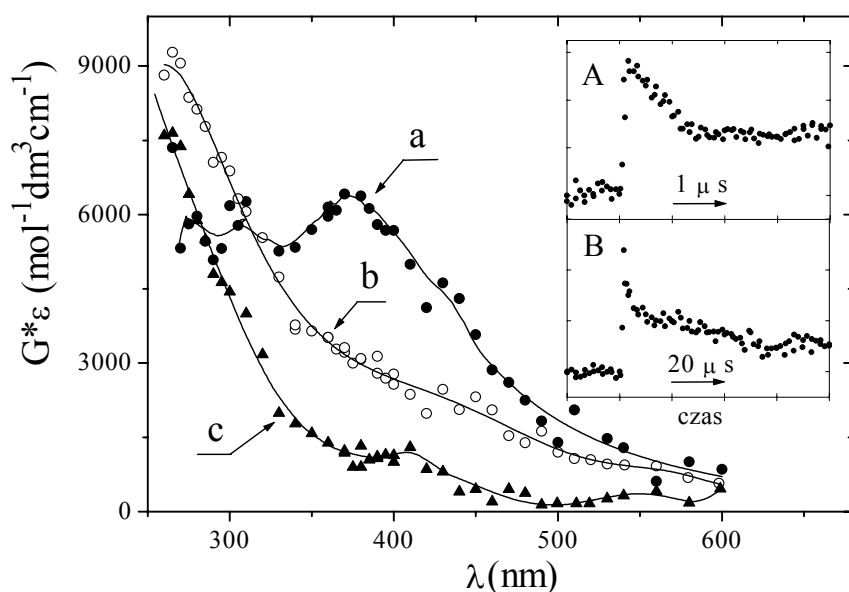


Rys. 4.2.5_2 Widma absorpcyjne produktów przejściowych nasyconych N_2O roztworów $2 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} Glu(Cys(Me)Gly) w pH 1 $2,5 \mu\text{s}$ po impulsie (a) oraz $2 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} Glu(MetGly) w pH 1 $2 \mu\text{s}$ po impulsie (b).

Kinetyka zaniku tego pasma zmierzona w $\lambda = 390$ nm jest identyczna jak w roztworach o wyższym stężeniu co potwierdza, że obserwowanym indywiduum w

roztworach silnie kwaśnych jest kationorodnik z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S...O.

Z kolei oczekiwany czas życia kationorodnika z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S...N nie powinien być dłuższy od kilkuset nanosekund; ponadto jego tworzeniu powinien sprzyjać dłuższy czas życia rodnika hydroksysulfuranylowego (Schöneich *i in.* 1994). Założenia te znalazły całkowite potwierdzenie w obserwacji widm absorpcji i kinetyk w roztworach Glu(Cys(Me)Gly) o tym samym stężeniu i w pH zbliżonym do obojętnego (pH ~6,6).

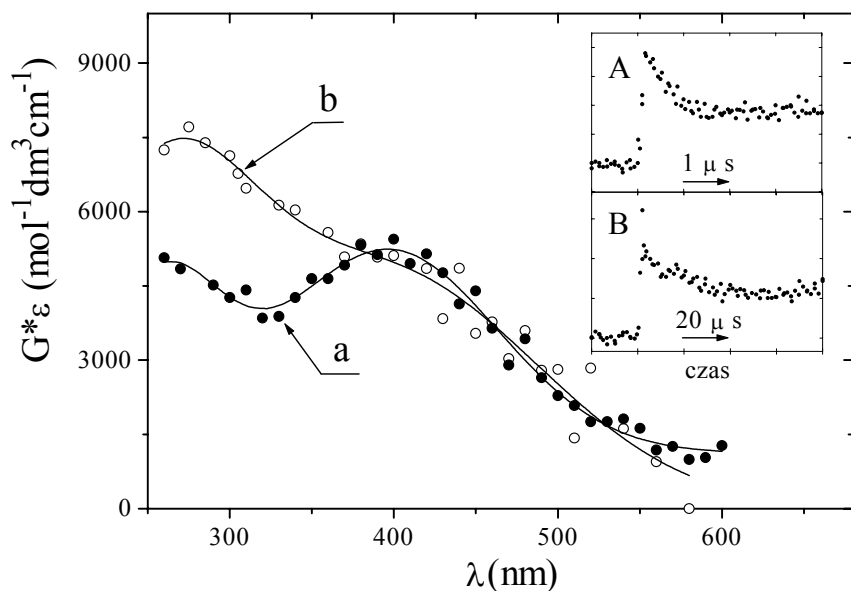


Rys. 4.2.5_3 Widma absorpcyjne produktów przejściowych $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ roztworów Glu(Cys(Me)Gly) nasyconych N_2O , w pH 6,6 150 ns (a), 2,38 μs (b) 65 μs po impulsie (c). Wstawka A - kinetyka zaniku pasma absorpcji zarejestrowana w $\lambda = 380 \text{ nm}$. Wstawka B - kinetyka zaniku pasma absorpcji zarejestrowana w $\lambda = 380 \text{ nm}$ w pH 6,6.

Szerokie pasmo absorpcji zarejestrowane w skali kilkuset nanosekund (4.2.5_3 krzywa a) charakteryzuje się dwoma maksimami absorpcji w okolicach 300 nm i 380 nm, którym towarzyszy od strony długofalowej słabo wykształcone ramię w okolicach 450 nm. Kinetyki zarejestrowane w $\lambda = 380 \text{ nm}$ wskazują wyraźnie na dwuwykładniczy zanik; jeden w skali czasowej $\sim 1 \mu\text{s}$ (wstawka A w rysunku 4.2.5_3), drugi w skali czasowej $\sim 100 \mu\text{s}$ (wstawka B w rysunku 4.2.5_3). Widmo absorpcji zarejestrowane w pojedynczych mikrosekundach (rysunek 4.2.5_3 krzywa b) charakteryzuje się intensywnym pasmem absorpcji od strony ultrafioletu bez

wyraźnego maksimum, z lekko zaznaczonym ramieniem w okolicach 380 nm. Z kolei widmo absorpcji po $\sim 65 \mu\text{s}$ (rysunek 4.2.5_3 krzywa c) jest zbliżone do poprzedniego widma, z dodatkowo lekko wykształconym ramieniem w okolicach 290 nm i o słabszej intensywności ramieniem w okolicach 380 nm. Obserwacje te pozwalają wysunąć przypuszczenie (patrz - dyskusja wyników), że w pH bliskim obojętnemu tworzą się indywidua z wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami zarówno typu S...N (krótkożyciowe) jak i typu S...O (długożyciowe).

S-*n*-butyloglutation (Glu(Cys(*n*Bu)Gly)): Zasadniczo podobny obraz widm absorpcji jak w Glu(Cys(Me)Gly) obserwowano w Glu(Cys(*n*Bu)Gly), aczkolwiek występują pewne różnice związane z udziałem w nich poszczególnych indywiduów. W środowisku silnie kwaśnym (pH 1) w czasie $\sim 1,2 \mu\text{s}$ obserwuje się szerokie pasmo absorpcji z wyraźnym maksimum w $\lambda = 390 \text{ nm}$, któremu towarzyszy pasmo absorpcji w obszarze ultrafioletu z maksimum w $\lambda < 260 \text{ nm}$ (rysunek 4.2.5_4, krzywa a).



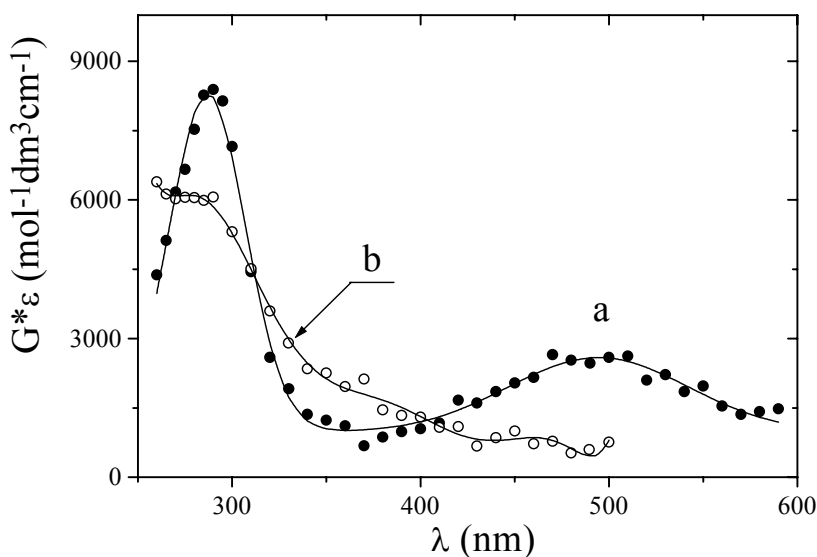
Rys. 4.2.5_4 Widma absorpcyjne produktów przejściowych $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ roztworów Glu(Cys(*n*Bu)Gly) nasyconych N_2O , w pH 1 $1,2 \mu\text{s}$ (a) i w pH 6,95 200 ns (b). Wstawka A - kinetyka zaniku pasma absorpcji zarejestrowana w $\lambda = 390 \text{ nm}$ w pH 6,95. Wstawka B - kinetyka zaniku pasma absorpcji zarejestrowana w $\lambda = 390 \text{ nm}$ w pH 6,95.

W obszarze 450 - 500 nm nie jest wykształcone ramię absorpcji, co świadczy o niższej wydajności tworzenia się kationorodnika dimerowego z

międzycząsteczkowym wiązaniem S:S w porównaniu z Glu(Cys(Me)Gly). Jeszcze wyraźniejsza różnica występuje w widmach absorpcji obu tych związków zarejestrowanych w skali czasowej kilkuset nanosekund i w pH zbliżonym do obojętnego. Dla tego samego stężenia Glu(Cys(*n*Bu)Gly) ($1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³) nie obserwuje się pasma absorpcji z wyraźnym maksimum w $\lambda = 390$ nm, a jedynie szerokie ramię absorpcji w obszarze 350 - 500 nm (rysunek 4.2.5_4 krzywa b). Kinetyka zaniku zarejestrowana w $\lambda = 390$ nm (wstawki w rysunku 4.2.5_4) ma wyraźnie charakter dwuwykładniczy (podobnie jak w Glu(Cys(Me)Gly)), co świadczy o tworzeniu się indywiduów z wiązaniami trójelektronowymi typu S:N i S:O, które charakteryzują się różnymi czasami życia. Z kolei (porównując intensywności krótkożyłowej absorpcji w obszarze 380 - 390 nm) wydajność kationorodnika z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S:N w Glu(Cys(*n*Bu)Gly) jest niższa w porównaniu do Glu(Cys(Me)Gly).

γ -glutamilo-metionilo-glicyna (Glu(MetGly)): W celu definitywnego rozstrzygnięcia, czy obserwowanym indywiduum przejściowym w roztworach silnie kwaśnych (pH 1) S-alkilowych pochodnych glutationu jest kationorodnik z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym pomiędzy siarką i tlenem z grupy karbonylowej wiązania peptydowego, przeprowadzono eksperymenty, w których jednostkę S-alkilocysteiny zastąpiono jednostką metioninową. W tym ostatnim przypadku powstający kationorodnik z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym pomiędzy siarką i tlenem z grupy karbonylowej wiązania peptydowego miałby sześcioczłonową strukturą cykliczną. Taka konformacja, chociaż jest stabilna termodynamicznie, to w porównaniu do konformacji cyklicznej pięcioczłonowej powinna tworzyć się znacznie wolniej. Na poparcie tej tezy służą wyniki dla homometioniny, gdzie w roztworach kwaśnych (pH 1) nie obserwowano kationorodnika z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym pomiędzy siarką i azotem (sześcioczłonowa konformacja cykliczna), w przeciwieństwie do roztworów metioniny, w których obserwowany kationorodnik z wewnątrz-cząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym pomiędzy siarką i azotem ma pięcioczłonową strukturę cykliczną (patrz punkty 4.2.2. i 4.2.4.). Do podobnych wniosków prowadzą obserwacje w roztworach 4-metylotiobutanolu, którego utlenianie rodnikami OH jak i 4-karboksybenzofenonem w stanie trypletowym nie prowadzi do indywiduów przejściowych z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym pomiędzy siarką i tlenem grupy hydroksylowej (sześcioczłonowa konformacja cykliczna) (Bobrowski *i in.* 1997). Z kolei podczas utleniania 3-metylotiopropanolu oraz 3,3'-tiodipropanolu

zarówno rodnikami OH jak i 4-karboksybenzofenonem w stanie trypletowym obserwowano tworzące się z dużą wydajnością indywidua przejściowe z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S:O (pięcioczłonowa konformacja cykliczna) (Schöneich i Bobrowski 1993, Bobrowski *i in.* 1997). Przypuszczenia te znalazły całkowite potwierdzenie poprzez obserwację widm absorpcji w roztworach Glu(MetGly) w pH 1 i o stężeniu $2 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} (rysunek 4.2.5_2 krzywa b). Zarejestrowane widmo absorpcji na skali pojedynczych mikrosekund charakteryzuje się wyraźnie wykształconym maksimum absorpcji w $\lambda_{\text{max}} = 285$ nm oraz słabszej intensywności pasmem, bez wyraźnie wykształconego maksimum, w zakresie 350 - 500 nm. Przez analogię do innych związków tioeterowych pasmo absorpcyjne z maksimum w $\lambda = 285$ nm zostało przypisane rodnikom α -(alkilotio)alkilowym, natomiast szerokie pasmo w zakresie 350 - 500 nm superpozycji pasm absorpcji kationorodników z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem S:O oraz kationorodników dimerowych z międzycząsteczkowym wiązaniem S:S. Widmo absorpcji po ~ 13 μs (rysunek 4.2.5_5 krzywa a) jest zbliżone do poprzedniego widma, ale ze znacznie intensywniejszym pasmem absorpcji charakteryzującym się $\lambda_{\text{max}} = 285$ nm oraz wyraźnie wykształconym pasmem absorpcji kationorodników dimerowych z międzycząsteczkowym wiązaniem S:S z $\lambda_{\text{max}} = 500$ nm.



Rys. 4.2.5_5 Widma absorpcyjne produktów przejściowych $2 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} roztworów Glu(MetGly) nasyconych N_2O , 13 μs po impulsie w pH 1 (a) i w pH 6,6 (b).

W pH 6,6, w tej samej skali czasowej i dla tego samego stężenia Glu(MetGly) zmienia się zasadniczo obraz widma (rysunek 4.2.5_5 krzywa b). Nie obserwuje się dwóch wyraźnie wykształconych maksimów absorpcji w $\lambda_{\text{max}} = 285 \text{ nm}$ i 500 nm , lecz jedynie pasmo absorpcji, bez wyraźnie wykształconego maksimum, w obszarze 260 - 300 nm. Pasma to można przypisać superpozycji pasm absorpcji rodników α -aminoalkilowych i α -(alkilotio)alkilowych.