

**Aufklärung des Reaktionsmechanismus von  
isotopenmarkiertem Ergothionein mit Singulett-Sauerstoff  
mittels hochauflösender Massenspektrometrie**



Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Lea Hartmann**

aus Bad Honnef

Köln, 2023

Berichtersteller:  
(Gutachter)

Prof. Dr. Dirk Gründemann  
Prof. Dr. Jan Riemer

Tag der mündlichen Prüfung:

18.09.2023

Diese Veröffentlichung wurde als Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln angenommen.

# ZUSAMMENFASSUNG

Ergothionein (ET), ein Imidazol-2-thion-Derivat von Histidinbetain, ist ein natürlich vorkommendes Antioxidans und wird als mögliches Vitamin gehandelt. Unlängst wurden eine hohe Reaktivität von ET gegenüber Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) sowie die dabei entstandenen Reaktionsprodukte nachgewiesen (Stoffels et al., 2017). Zudem wurde erstmals ein mehrschrittiger, nicht-enzymatischer Regenerationsmechanismus von ET nach Reaktion mit  $^1\text{O}_2$  durch Glutathion (GSH) beschrieben (Oumari et al., 2019). Die Synthese der isotopenmarkierten ET-Verbindungen D5-ET und  $^{34}\text{S}$ -ET eröffnete die Möglichkeit, die bisherigen Interpretationen der Reaktionsprodukte über eine umfassende Strukturaufklärung zu verifizieren und zu überarbeiten. Hierbei wurde reiner  $^1\text{O}_2$  durch Thermolyse des Endoperoxids DHPNO<sub>2</sub> bei 37 °C erzeugt. Mithilfe von Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit hochauflösender Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-HRMS/MS) konnte anhand der akkuraten Masse die chemische Zusammensetzung der einzelnen Reaktionsprodukte ermittelt werden und über die Fragmentierungsmuster auf die Struktur geschlossen werden.

Lebende Zellen, die mit D5-ET und einem Photosensibilisator inkubiert worden waren, zeigten trotz Belichtung einen Erhalt des Deuteriums an Position 5 des Imidazolrings. Indessen unterschieden sich die zuvor charakterisierten ET-Produkte 262 und 264 sowie 551 und 553 unter Verwendung von D5-ET durch eine teilweise Eliminierung desselben Deuteriums *in vitro*. Der Erhalt des Deuteriums steht im deutlichen Widerspruch zu dem zuvor postulierten Regenerationsmechanismus. Basierend auf den überarbeiteten Reaktionsprodukten mit D5-ET, greift  $^1\text{O}_2$  ET auf dem Hauptreaktionsweg direkt am Imidazolring unter Bildung eines Hydroperoxids an. In Gegenwart von GSH wird ET über die Zwischenprodukte 246-A und 553 effizient regeneriert. Deutlich langsamer entstehen die Nebenprodukte 262 und 551 nach intramolekularer Wasserabspaltung der Hydroperoxide. Darüber hinaus ermöglicht die Nebenreaktion von  $^1\text{O}_2$  mit dem Schwefelatom die langsame Bildung von Intermediat 246-A über einen alternativen Reaktionsweg und folglich die Regeneration von ET über die Generation eines Sulfin-Intermediats. Jedoch überwog der Angriff auf die Ringstruktur um den Faktor 6, gemessen an den entsprechenden Reaktionsprodukten von Verbindung 264 bei Substitution von Wasser durch Methanol. In Gegenwart von 1 mM GSH kam es zur vollständigen Aufhebung beider postulierten Nebenreaktionswege, während die Regeneration von ET über den Hauptreaktionsweg dominierte.

# ABSTRACT

Ergothioneine (ET), a 2-thiourea derivative of histidine betaine, is a naturally occurring antioxidant and is considered as a potential “longevity vitamin”. Recently, the high reactivity of ET has been demonstrated towards singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) along with the reaction products formed (Stoffels et al., 2017). In addition, for the first time, a non-enzymatic multistep regeneration mechanism of ET after reaction with  $^1\text{O}_2$  by glutathione (GSH) was reported (Oumari et al., 2019). The synthesis of the isotopically labeled ET compounds D5-ET and  $^{34}\text{S}$ -ET opened the possibility to verify and revise the previous interpretations of the reaction products via comprehensive structural elucidation. Here, pure  $^1\text{O}_2$  was generated by thermolysis of the final peroxide DHPNO<sub>2</sub> at 37 °C. Using high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution tandem mass spectrometry (HPLC-HRMS/MS), the accurate mass was used to elucidate the chemical composition of each reaction product and to infer the exact structure via fragmentation patterns.

Living cells incubated with D5-ET and a photosensitizer showed preservation of deuterium at position 5 of the imidazole ring despite exposure to light. Whereas the previously characterized ET products 262 and 264 as well as 551 and 553 differed by a partial elimination of the same deuterium *in vitro* using D5-ET. The retention of the deuterium is in clear contradiction to the proposed regeneration mechanism. Based on the revised reaction products with D5-ET,  $^1\text{O}_2$  attacks ET in the main reaction pathway directly at the imidazole ring to form a hydroperoxide. In the presence of GSH, ET is efficiently regenerated via the intermediates 246-A and 553. Much more slowly, the by-products 262 and 551 are formed after intramolecular water cleavage of the hydroperoxides. Moreover, the side reaction of  $^1\text{O}_2$  with the sulfur atom allows the slow formation of intermediate 246-A by an alternative reaction pathway and consequently the regeneration of ET via the generation of a sulfine intermediate. However, the attack on the ring structure predominated by a factor of 6, as measured by the reaction products corresponding to compound 264 upon substitution of water by methanol. In the presence of 1 mM GSH, complete abolition of both side reaction pathways occurred, while regeneration of ET dominated.

# LITERATURVERZEICHNIS

- Oumari, M., Goldfuss, B., Stoffels, C., Schmalz, H. G., & Gründemann, D. (2019). Regeneration of ergothioneine after reaction with singlet oxygen. *Free Radic Biol Med*, *134*, 498-504.
- Stoffels, C., Oumari, M., Perrou, A., Termath, A., Schlundt, W., Schmalz, H. G., Schafer, M., Wewer, V., Metzger, S., Schömig, E., & Gründemann, D. (2017). Ergothioneine stands out from hercynine in the reaction with singlet oxygen: Resistance to glutathione and TRIS in the generation of specific products indicates high reactivity. *Free Radic Biol Med*, *113*, 385-394.