

**Cisztein származékok poliszulfidációjának  
biológiailag releváns mechanizmusai**

**Doktori – (PhD) – értekezés**



**Bogdándi Virág**

**Doktori iskola: Interdiszciplináris Orvostudományok  
Doktori iskola programvezetője: Prof. Dr. Sümegei Balázs  
Program: Molekuláris és celluláris biokémia  
Programvezető: Prof. Dr. Sümegei Balázs  
Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter**

**Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar**

**Országos Onkológiai Intézet**

**2019**

<b>1.</b>	<b>Bevezetés .....</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>11</b>
2.1.	A kénhidrogén képződése és bomlása biológiai rendszerekben .....	11
2.2.	Szervetlen poliszulfidok jelentősége jelátviteli folyamatokban, fehérje perszulfidációs útvonalak .....	14
2.3.	Cisztein per- és poliszulfidok detektálása .....	19
2.4.	A kénhidrogén és a nitrogén-monoxid által vezérelt jelátvitel összefonódása, nitrozoperszulfid mint az NO-szulfid kölcsönhatás egyik kulcsfontosságú köztiterméke.....	25
2.5.	Tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák és aktiválásuk .....	28
<b>3.</b>	<b>Célkitűzések .....</b>	<b>30</b>
<b>4.</b>	<b>Anyag és módszer .....</b>	<b>32</b>
4.1.	Vegyszerek és oldatok .....	32
	Felhasznált vegyszerek listája és forgalmazói.....	33
	Oldatok receptjei .....	35
4.2.	Műszerek és módszerek .....	38
4.2.1.	UV-Vis spektrofotometria .....	38
4.2.2.	Szulfidkoncentráció meghatározása metilénkék módszerrel .....	38
4.2.3.	Szufán kéntartalom meghatározása hideg cianolízissel.....	39
4.2.4.	Tömegspektrometriával kombinált folyadékkromatográfia .....	39
4.2.4.1.	Szervetlen poliszulfidok analízise .....	39
4.2.4.2.	Poliszulfidált CySH és GSH módosulatok analízise .....	40
4.2.4.3.	Poliszulfidált GAPDH-dimedon adduktok analízise .....	41
4.2.4.4.	Poliszulfidált glutation – IAM adduktok analízise .....	41
4.2.4.5.	Poliszulfidált és oxidált cisztein – dimedon adduktok analízise .....	41
4.2.5.	Poliszulfidált CySH és GSH minták alkilálása .....	42
4.2.6.	Fehérjeszintű vizsgálatok.....	42
4.2.6.1.	Bradford és BCA eljárások.....	42

4.2.6.2. Glicerinaldehid–3–foszfát–dehidrogenáz minták készítése .....	43
4.2.6.3. Humán szérum albumin minták készítése ProPerDP eljáráshoz .....	44
4.2.6.4. SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE).....	44
4.2.6.5. Coomassie Brilliant Blue gélfestés.....	44
4.2.6.6. Western blot, előhívás .....	45
4.2.7. Sejtkultúrák és kezelések .....	45
4.2.7.1. HEK293 sejtek és kezelésük .....	45
4.2.7.2. TRPA1 expresszázó és TRPA1 deficiens CHO sejtek és kezelésük .....	46
<b>5. Eredmények és értékelésük .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1. Reaktív kénszármazékok detektálása biológiai rendszerekben .....</b>	<b>47</b>
5.1.1. Szervetlen poliszulfidok speciációja.....	47
5.1.2. Poliszulfidált cisztein oldalláncok speciációja .....	57
5.1.3. Poliszulfidált GAPDH oldalláncok alkilálása.....	62
<b>5.2. Cisztein–poliszulfénsavak dimedonos detektálása.....</b>	<b>63</b>
5.2.1. Oxidáció által keletkező poliszulfénsavak dimedonnal történő detektálása....	63
5.2.2. Hidrolízis által keletkező cisztein–poliszulfénsavak dimedonnal történő detektálása .....	65
<b>5.3. A kénhidrogén és a nitrogén–monoxid által vezérelt jelátviteli útvonalak összefonódása .....</b>	<b>66</b>
5.3.1. Nitrozoperszulfid, a nitrozotiolok és szulfid kölcsönhatásának egyik fő köztterméke – spektrális és kinetikai jellemzés .....	67
5.3.2. Nitrozoperszulfid reakciója redukálószerrel .....	70
5.3.3. A tioredoxin és glutation enzimrendszerek hatása nitrozoperszulfid bomlására	72
5.3.4. Nitrozoperszulfid általi késleltetett perszulfidáció és poliszulfidáció .....	74
5.3.4.1. Szervetlen poliszulfidok képződése nitrozoperszulfid bomlása során .....	74
5.3.4.2. Késleltetett poliszulfidáció redukált glutationon .....	77
5.3.4.3. Késleltetett perszulfidáció humán szérum albuminon .....	79
5.3.4.4. Késleltetett poliszulfidáció HEK293 sejteken .....	80
5.3.4.5. Késleltetett poliszulfidáció TRPA1 ionszatórnákon.....	81

<b>6.</b>	<b>Összefoglalás .....</b>	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>88</b>
<b>8.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>91</b>
<b>9.</b>	<b>Dokumentált publikációs tevékenység .....</b>	<b>92</b>
	<b>9.1. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk.....</b>	<b>92</b>
	<b>9.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó publikációk.....</b>	<b>94</b>
<b>10.</b>	<b>Konferencia előadások, posztterek listája.....</b>	<b>95</b>
	<b>10.1. Az értekezéshez kapcsolódó konferencia előadások, posztterek listája .....</b>	<b>95</b>
	<b>10.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó konferencia előadások, posztterek listája</b>	<b>98</b>
<b>11.</b>	<b>Hivatkozások.....</b>	<b>102</b>

## Rövidítések jegyzéke

<b>2-ME</b>	2-merkaptoetanol
<b>3MST</b>	3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz
<b>AAT</b>	aszpartát-aminotranszferáz
<b>APS</b>	ammónium-persulfát
<b>ATP</b>	adenozin-trifoszfát
<b>BCA</b>	bicinkoninsav
<b>BSA</b>	szarvasmarha szérum albumin
<b>CARS, CPERS</b>	ciszteinil-tRNS szintetáz enzim
<b>CBB</b>	Coomassie Brilliant Blue
<b>CBS</b>	cisztationin- $\beta$ -szintetáz
<b>CHO</b>	Chinese Hamster Ovary
<b>Cys, CysH</b>	cisztein
<b>CSE</b>	cisztationin- $\gamma$ -liáz
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DTPA</b>	dietilén-triamin-pentaecetsav
<b>DTT</b>	D,L-ditiotreitol
<b>ECS</b>	extracelluláris oldat
<b>EGFR</b>	epidermális növekedési faktor receptor
<b>ESI-MS</b>	elektroporlasztásos tömegspektometria
<b>Fura 4-AM</b>	fura-4 acetoxi-metilészter
<b>GR</b>	glutation reduktáz
<b>GSH</b>	glutation
<b>GSNO</b>	S-nitrozoglutation
<b>HEK293</b>	human embryonic kidney 293 sejtvonat
<b>HEPES</b>	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav
<b>HPE-IAM</b>	$\beta$ -hidroxifenil-4-etil-jódacetamid
<b>HSA</b>	humán szérum albumin

<b>HSNO</b>	tiosalétromossav
<b>IAM</b>	jódacetamid
<b>Keap1</b>	Kelch-like ECH-associated protein 1 enzim
<b>LC-MS</b>	folyadékkromatográfiával kombinált tömegspektrometria
<b>MBB</b>	monobromobimán
<b>MMTS</b>	metil-metántioszulfonát
<b>NAP</b>	N-acetil-DL-penicillamin
<b>NEM</b>	N-étilmaleimid
<b>NO</b>	nitrogén-monoxid
<b>Nrf2</b>	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 enzim
<b>PBS</b>	foszfátpuffert tartalmazó sóoldat
<b>PMSA</b>	polietilén-glikol-konjugált maleimid jelölésen alapuló gélelektroforézis
<b>PNP<sup>+</sup></b>	bisz-trifenilfoszfin iminium kation
<b>ProPerDP</b>	Protein Persulfide Detection Protocol
<b>PTEN</b>	foszfatáz-tenzin homológ enzim
<b>PTP1B</b>	fehérje-tirozin-foszfatáz-1B enzim
<b>RIPA</b>	radioimmunprecipitációs puffer
<b>roGFP</b>	redox érzékeny zöld fluoreszcens fehérje
<b>—S(S)<sub>n</sub>OH</b>	politioszulfénsav
<b>—SSH</b>	perszulfid
<b>—SOH</b>	szulfénsav
<b>—SH</b>	tiol
<b>—SSOH</b>	pertioszulfénsav
<b>SDS-PAGE</b>	nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
<b>SNAP</b>	S-nitrozo-N-acetil-DL-penicillamin
<b>Src</b>	proto-onkogén tirozin-protein kináz
<b>SRM</b>	single reaction monitoring
<b>SSNO<sup>-</sup></b>	nitrozoperszulfid
<b>SSP4</b>	Sulfane Sulfur Probe 4
<b>SULFI/NO</b>	dinitrozoszulfid

<b>TBST</b>	TBS–TWEEN puffer
<b>TEMED</b>	tetrametil–etilén–diamin
<b>TRIS</b>	trisz(hidroximetil)–aminometán
<b>TRP14</b>	14 kDa molekulatömegű, tioredoxinhoz hasonló funkciójú fehérje
<b>TRPA1</b>	transziens receptor potenciál ankyrin1 ioncsatornák
<b>Trx</b>	tioredoxin
<b>TrxR</b>	tioredoxin reduktáz
<b>UV–Vis</b>	UV–látható spektrofotometria

# 1. Bevezetés

Doktori kutatómunkám során a kénhidrogén (hidrogén–szulfid) által vezérelt jelátviteli folyamatok molekuláris mechanizmusainak tanulmányozását tűztem ki célul. (Oldatban a kénhidrogén különböző protonáltsági fokkal fordulhat elő:  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$  és  $\text{S}^{2-}$ , melyeket egységesen szulfidként fogok nevezni a disszertáció további részében).

Hosszú éveken keresztül a kénhidrogén csupán toxicitásáról volt ismert, ugyanis nagy koncentrációban a *citokróm-c-oxidáz* enzim inhibícióján keresztül a mitokondriális sejtlégzés gátlásához vezet. Ennek ellenére meglepő módon, viszonylag nagy szulfidkoncentrációt mértek többek között posztmortem humán agyszövetben<sup>1,2</sup>, ezt követően pedig több kutatás eredménye is arra vezetett, hogy a kénhidrogén az élő szervezetben enzimátikus és nem enzimátikus útvonalakon is termelődik, kisebb koncentrációkban pedig több biokémiai útvonalat is szabályoz. Mára már számos fiziológias és patofiziológias folyamatban igazolták kulcsfontosságú szerepét többek között a sejten belüli jelátviteli útvonalak szabályozásán keresztül, melynek eredményeként a nitrogén–monoxid és a szén–monoxid mellett a kénhidrogént is kis jelátviteli molekulaként tartják számon<sup>3</sup>. Ennek megfelelően robbanásszerű fejlődést mutat biológiai funkcióinak kutatása, így nagyszámú tudományos közlemény jelent illetve jelenik meg a témában mind a mai napig<sup>4</sup>. Sajnálatos módon ezek tanulmányozásakor sokszor ellentmondásokba ütközhetünk, amelynek oka a biológiai hatás kiváltásáért felelős molekuláris mechanizmusok tisztázatlansága illetve hiányos ismerete. Kutatócsoportunk a kénhidrogén által kiváltott biokémiai folyamatokat a következő reakcióutak vizsgálatával tanulmányozza:

- Tiol–fehérjék működésének vezérlése és oxidatív stressz elleni védelme perszulfid funkciós csoportok keletkezésén keresztül
- Metalloenzimek funkcióinak vezérlése szulfiddal való kölcsönhatásaikon keresztül
- A szulfid és nitrogén–monoxid által vezérelt jelátviteli utak kölcsönös szabályozása

Kutatómunkám során nagyrészt a cisztein oldalláncokon végbemenő per- és poliszulfidációs folyamatokra fókuszáltam, melyek detektálása a mai napig komoly kihívást jelent. Ennek kapcsán egy átfogó és szisztematikus tanulmányban vizsgáltuk a jelenleg alkalmazott eljárások előnyeit, hátrányait, illetve határait<sup>5</sup>. Több biológiailag is releváns modellen (szervetlen poliszulfidok, kis molekulatömegű tiolok (cisztein, glutation),



tiolfehérjék) szemléltettük az egyes módszerek során használt elektrofil ágensek hatását a detektált módosulatok speciációjára. Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy három, széles körben alkalmazott alkilálószer ( $\beta$ -hidroxifenil-4-etil-jódacetamid (HPE-IAM), monobromobimán (MBB), N-etilmaleimid (NEM)) elektrofilicitása, koncentrációja, illetve az inkubálási idő hogyan befolyásolja a detektált módosulatok eloszlását a reaktív kén-származékok közötti dinamikus redox egyensúlyi reakciók eltolása, valamint a poliszulfid láncok hasítása révén. A poliszulfid láncok alkilálás indukálta hasításának mechanizmusára több javaslatot is tettünk, melyek közül az egyik a hidrolitikus egyensúlyi reakció, amely többek között szulfén-sav származékok képződését eredményezi. Ez utóbbi megközelítés biokémiai szempontból rendkívül kritikus, és a korábban szulfén-savként azonosított módosulatok valós koncentrációjának újragondolását, valamint a detektálási eljárások során kapott eredmények körültekintő értelmezésének szükségességét vonja maga után.

Poliszulfidok mint jelátviteli molekulák a szulfid és a nitrogén-monoxid által vezérelt jelátvitel összefonódása során is keletkezhetnek, egy közös jelátviteli köztitermék, a nitrozoperszulfid keletkezése és bomlása során<sup>6</sup>. Kutatómunkám során kísérleteket folytattam a nitrozoperszulfid kémiai karakterizálására, tanulmányoztam bomlási reakcióit, majd több modellrendszeren is vizsgáltam biológiai hatását. Kutatócsoportunk korábban már megmutatta, hogy a nitrozoperszulfid lassú bomlása többek között szerves poliszulfidok felszabadulásához vezet, melyet az általam elvégzett spektrális jellemzés eredményei is megerősítettek. Kinetikai kísérleteim arra engednek következtetni, hogy a nitrozoperszulfid több sejten belüli redukáló rendszert (tioredoxin, glutation rendszer) kikerülve, lassú bomlása során poliszulfid donorként funkcionálhat. Per- és poliszulfidációs reakciókat indít el, ezáltal közvetítőként vehet részt egyes jelátviteli útvonalakban. A nitrozoperszulfid általunk feltételezett elnyújtott per- és poliszulfidációs hatását több biológiailag releváns modellrendszeren is igazoltuk (redukált glutation, humán-szérum-albumin, HEK293 sejtek).

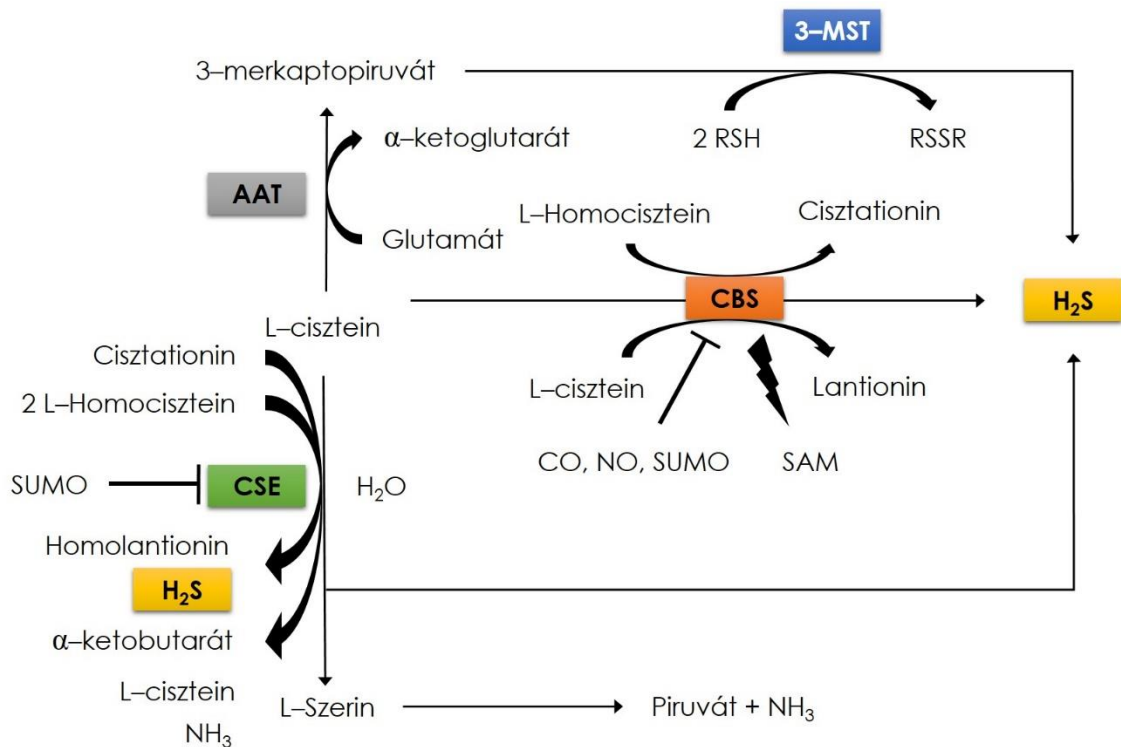
Végül, az előbb említett modellrendszerek mellett, sejtes rendszerekben *transziens receptor potenciál ankyrin 1* (TRPA1) receptorokon is sikerült megmutatnunk a nitrozoperszulfid által kibocsátott szerves poliszulfidok hatására lejátszódó elnyújtott aktivációt. Az irodalomból ismert, hogy a szerves poliszulfidok rendkívül hatékony TRPA1 agonisták<sup>8</sup>, a nitrozoperszulfid pedig lassú poliszulfid donorként a receptorok közvetett aktivátoraként funkcionálhat, amelyet áramlási citometriás kísérleteink során sikerült igazolnunk.

A fentiek értelmében úgy gondolom, doktori kutatómunkám eredményei több szempontból is hozzájárulnak a kénhidrogén által vezérelt jelátviteli folyamatok molekuláris mechanizmusainak mélyebb értelmezéséhez és megértéséhez.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A kénhidrogén képződése és bomlása biológiai rendszerekben

A kénhidrogén az emberi szervezetben a cisztein aminosav metabolizmusa során keletkezik enzimatis és nem enzimatis útvonalakon<sup>9</sup>. Előbbit három enzim(rendszer) katalizálja: a piridoxál-foszfát függő *cisztationin-β-szintetáz* (CBS) és *cisztationin-γ-liáz* (CSE), valamint az *aszpartát/cisztein-aminotranszferáz* (AAT) és *3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz* (3MST) együttes működése<sup>10,11</sup> (1. ábra). Bár mindhárom enzimrendszer a ciszteint használja szubsztrátként a szulfidtermelő folyamatokhoz, enzimkinetikai paramétereik nagyban különböznek: más kofaktorokkal működnek, enzimatis aktivitásuk eltér, valamint aktivációjuk és inhibíciójuk mechanizmusa is különbségeket mutat. Ennek következtében a kénhidrogén endogén, enzimatis termelődése nem csak az említett enzimek koncentrációjától és annak arányától függ, hanem számos egyéb paraméter befolyásolja, mint a szubsztrátok (cisztein, homocisztein, α-ketoglutarát) hozzáférhetősége, továbbá egyéb faktorok, amelyek az enzimatis aktivitást szabályozzák<sup>12,13</sup>.

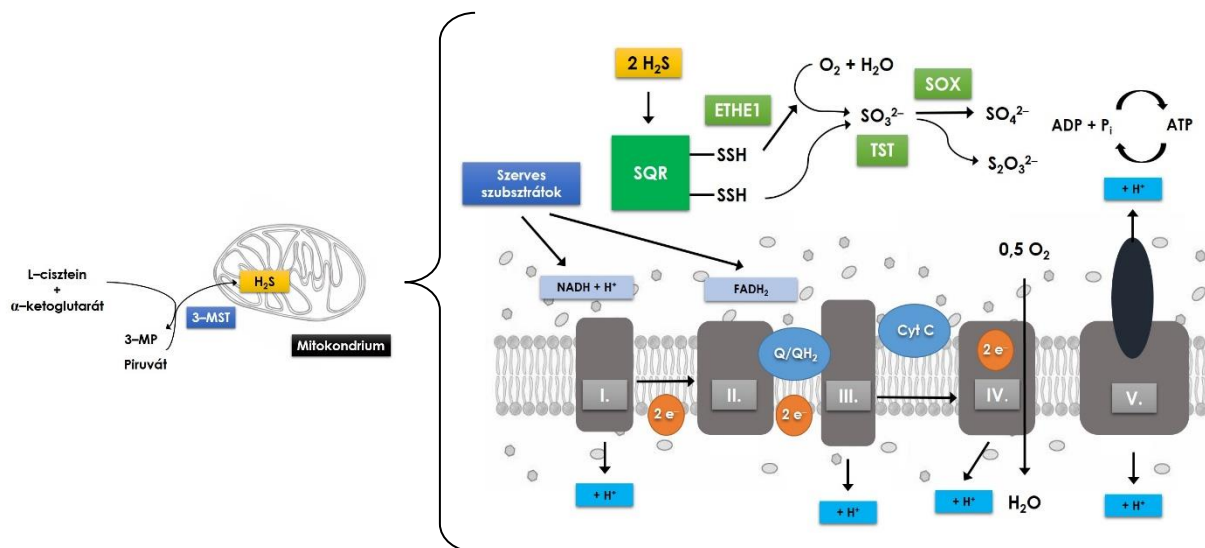


1. ábra: A kénhidrogén endogén képződése cisztein metabolizmusa során, enzimatis útvonalakon

(Az ábrát P. Nagy, *Methods in Enzymol* (2015)<sup>9</sup> alapján készítettem)

Cisztein mellett cisztinből is keletkezhet szulfid CBS illetve CSE által katalizált útvonalakon, melyek során egy  $\beta$ -eliminációt követően transzperszulfidációs és redukciós reakciók vezetnek kénhidrogén felszabadulásához cisztein- és glutation–perszulfid köztitermékeken keresztül<sup>14,15</sup>. Kinetikai tanulmányok során a cisztinre kapott jóval alacsonyabb  $K_M$  illetve magasabb  $k_{cat}$  érték arra enged következtetni, hogy ez az oxidált módosulat a ciszteinnél kedvezőbb szubsztrát lehet a CBS és CSE számára. A sejten belüli redukáló környezet következtében azonban az oxidált cisztin koncentrációja nagyságrendekkel kisebb, mint a ciszteiné, így az előbb említett reakciók endogén szulfidtermelésben játszott szerepe vitatottá vált<sup>16</sup>.

A szulfid lebontása főként a mitokondriumban történik oxidációs folyamatok révén<sup>17</sup>, melyeket a *szulfid-kinon-reduktáz* (SQR) enzim katalizál<sup>18,19</sup> (2. ábra). Ennek során az enzim belső diszulfid hídja redukálódik perszulfid köztitermékké, amely végül enzimátikus úton oxidálódik szulfáttá vagy tioszulfáttá<sup>20</sup>. Meglepő módon annak ellenére, hogy a szulfid toxicitása épp a mitokondriális sejtlegzés gátlásához kapcsolódik a *citokróm-c-oxidáz* inhibícióján keresztül, több tanulmányban is ismertették, hogy kisebb koncentrációkban az ATP termelés stimulálásához vezet, ugyanis elektrondonorként vesz részt a mitokondriális elektrontranszport folyamatokban<sup>17,21-23</sup>. Ezen reakciók szabályozása kiválóan szemlélteti a szulfid által vezérelt biokémiai folyamatok finomhangoltságát.

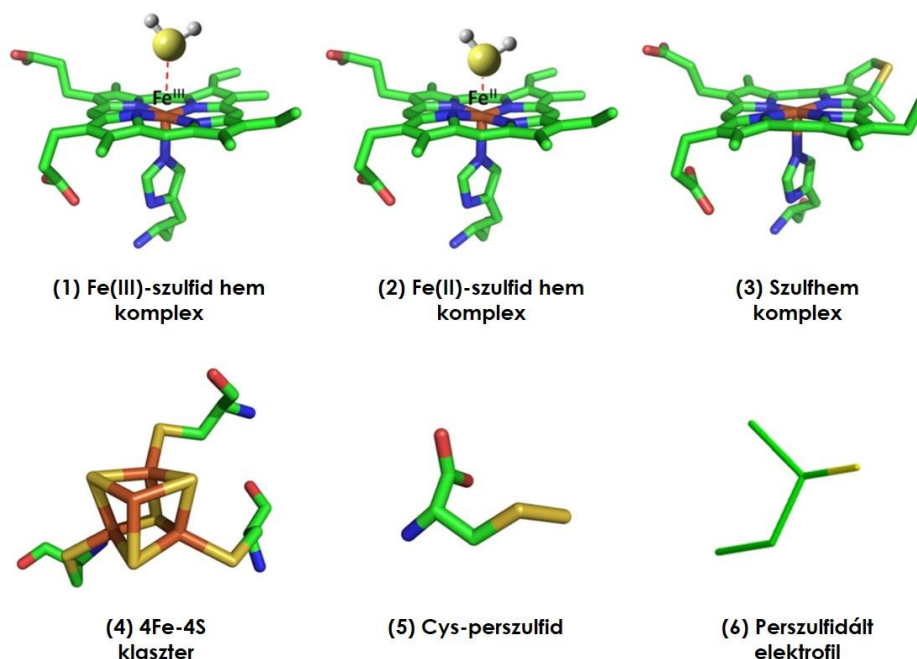


**2. ábra:** A kénhidrogén oxidatív lebontása, valamint részvétele a mitokondriális elektrontranszport folyamatokban  
(Az ábrát C. Szabo et al. Br Journal of Pharmacol (2014)<sup>17</sup> alapján készítettem)

A kénhidrogén biohasznosulása nem csak az endogén anabolikus reakciókra és katabolizmusra korlátozódik. Köztudott, hogy a szulfid jelentős része biomolekulákhoz kötődve tárolódik, amely reverzibilis kölcsönhatás valamilyen külső hatás következtében megszűnhet, szulfid felszabadulását eredményezve<sup>24</sup>. Számos tanulmány megmutatta, hogy a sejtes rendszerekben és szövetekben rendelkezésre álló szulfidmennyiség kevesebb, mint 1%-a található szabad formában, amely arra enged következtetni, hogy a biológiai szulfidraktárak rendkívül nagy kapacitással rendelkeznek. A reverzibilis kötődés megszűnését számos termodinamikai és kinetikai paraméter befolyásolja, amely elengedhetetlen ahhoz, hogy a szabad szulfid mennyisége a toxikus határ alatt maradjon. A szulfid ismert bioraktárai közül a 3. ábrán látható néhány példa.

Per- és polisulfidokon túl (melyek redukciója szulfid felszabadulásához vezet), soft karakteréből adódóan a szulfid kén donoratomján keresztül készségesen koordinálódik több átmenetifém-ionhoz, melyek gyakran biológiailag aktív molekulák építőelemei, illetve kofaktorai. A korábbi kutatások leginkább a réz(II)-, vas(II)- és vas(III) ionokkal való kölcsönhatásaira fókuszáltak, melyek többek között szerepet játszanak a *citokróm-c-oxidáz* szulfid általi gátlásában<sup>25-27</sup>. Hemfehérjékre jellemző, hogy a szulfid a porfirinvázba beépülve szulfhem formák képződéséhez vezet<sup>27</sup>. Ezek mellett pedig több vas–kén klaszter tartalmú fehérje is ismeretes, melyekből a szulfid szintén felszabadítható<sup>24</sup>. A reverzibilis kötődések, valamint a szulfid felszabadulásához vezető reakciók révén az előbb említett bioraktárak szulfid pufferként is viselkedhetnek, a szükséges helyen és időben eredményezve a kis jelátviteli molekula utánpótlását egy adott biológiai folyamat kapcsán. Az ezen reverzibilis egyensúlyi reakciók általi szulfidtermelést figyelembe véve, körültekintően indokolt eljárunk a különböző detektálási eljárások során alkalmazott kísérleti körülmények megválasztását illetően (például savas környezetben a vas–kén klaszterek szétesése, míg redukáló vagy lúgos környezetben a perszulfid forma átalakítása fog megnövekedett szulfidkoncentrációhoz vezetni).

A fémcentrumokhoz való koordináció mellett redox kapacitásából kifolyólag a kénhidrogén redukálni is képes ezeket a fémionokat, amely a metalloprotein aktivitás szabályozásának egy alternatív módja<sup>25, 28-30</sup>.



- 3. ábra:** A kénhidrogén biomolekulákkal való kölcsönhatását szemléltető modellek<sup>24</sup>: Koordináció hem vas(III) és vas(II)-ionokhoz (1,2), szulfhem komplex képződés (3), vas-kén klaszterek kialakulása (4), cisztein oldalláncok perszulfidációja (5), egyéb elektrofilek perszulfidációja (6)  
(Az ábrát a P. Nagy et al Biochim Biophys Acta (2014)<sup>24</sup> közlemény tartalmazza)

## 2.2. Szervetlen polyszulfidok jelentősége jelátviteli folyamatokban, fehérje perszulfidációs útvonalak

A közelmúltban számos kutatási eredmény rávilágított, így napjainkra már elfogadott, hogy a szulfid biológiai hatásai közül többért a részben oxidált, 0 vegyértékű kénatomot, úgynevezett szulfán ként tartalmazó molekulák, azok közül is főként a szervetlen polyszulfidok felelősek<sup>14,31-39</sup>, melyeket  $H_2S_x$  (ahol  $x = 2-9$ ) általános formulával jelölnék az irodalomban. Ez egyben magyarázatot is szolgáltat a szulfid által vezérelt folyamatok tanulmányozása során felmerült reprodukálhatatlan és nehezen értelmezhető eredményekre, ugyanis szervetlen polyszulfidok mindig előfordulnak szennyeződésként a szulfid sókban/oldatokban, ennek mértéke pedig az alkalmazott közegtől, valamint az oxidáció mértékétől függ. Jelenlétüket nagy szulfidfelesleg esetén sem lehet teljesen kizárni, ez pedig több esetben is kiválthatja az adott fiziológiás hatást, melyet korábban a szulfidhoz rendeltek<sup>24,31</sup>. Ennek fényében körültekintőbb vizsgálatokra,

valamint az eredmények átfogó értelmezésére van szükség, hiszen a poliszulfidok a kénhidrogén fő endogén oxidációs termékei, így a szulfid által vezérelt redox jelátvitelt nagymértékben befolyásolják. Redox kapacitásukat tekintve termodinamikailag instabil képződmények,  $pK_s$  értékük a lánchossz növekedésével csökken, de 7 alatt van, melynek következtében fiziológiás körülmények között monoanionos formában ( $HS_x^-$ ) vannak jelen<sup>40</sup>. Oxidálóképességük a láncban lévő kénatomok számával nő, eloszlásuk pedig rendkívül nehezen tanulmányozható dinamikus egymásba alakulásuk következtében. Redukáló illetve oxidálószer hiányában diszproporcionálódnak, biológiai rendszereken azonban még a diszproporció előtt elreagálnak.

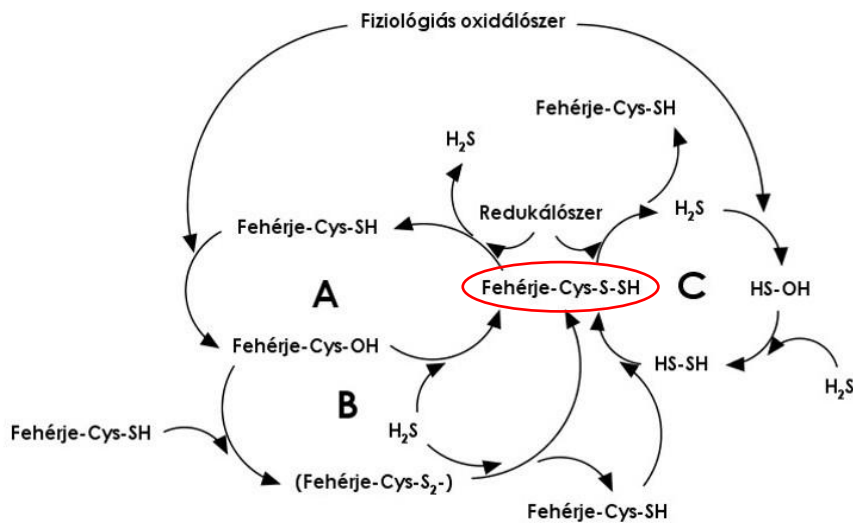
A szerves poliszulfidok bioaktivitásukon túl szulfidraktárként is funkcionálhatnak, hiszen enzimatisz redukciójuk szulfid képződéséhez vezet<sup>7</sup>.

A kénhidrogén által vezérelt jelátviteli utak közül leggyakrabban idézett folyamat a fehérje szulfhidráció vagy perszulfidképződés, azaz a cisztein –SH oldalláncok –SSH csoporttá történő konverziója, melyet először Snyder és munkatársai ismertettek a szakirodalomban<sup>41</sup>. A cisztein oldalláncok szulfhidrációja a poszttranszlációs módosítások körébe tartozik, és több kutatás eredménye is arra enged következtetni, hogy fiziológiás körülmények között számos fehérjén (mint például az aktin, tubulin, vagy a GAPDH) ez a módosulat detektálható. A fehérje perszulfid módosulatok redukzív körülmények között (DTT, enzimatisz útvonalak) visszaalakíthatók az eredeti tiollá, amely megakadályozza sejten belüli felhalmozódásukat, ezáltal pedig lehetővé teszi a jelátviteli utak során elengedhetetlen reverzibilis szabályozást<sup>7</sup>.

A szulfhidráció mint jelátviteli utakat szabályozó enzimek kovalens módosítása, számos esetben azok aktivitásának növekedését vagy csökkenését idézheti elő direkt vagy indirekt módon. *GAPDH* esetében az aktív *Cys150* szulfhidrációja az enzim glikolitikus aktivitásának hétszeres növekedéséhez vezetett<sup>41</sup>, (bár ezt azóta számos tanulmány, köztük saját eredményeink is cáfolták), a közlemény szerzőinek javaslata alapján pedig az ATP szenzitív  $K^+$ -csatornák aktivációja is megvalósulhat perszulfidáció által<sup>42</sup>. Az aktív ciszteineken történő perszulfidképződés legtöbb esetben a fehérje inhibíciójához vezet<sup>31,43,44</sup>, azonban egyes negatív szabályozó fehérjék gátlásán keresztül adott útvonalak közvetett aktivációját eredményezheti: például a *Keap1 Cys151*-jének szulfhidrációja a fehérje aktivitásának megszűnését, így pedig az *Nrf2* útvonal beindítását eredményezi<sup>44</sup>. Az enzimatisz aktivitás szabályozása mellett a tiolok perszulfidációja egyben védő funkció is lehet az oxidatív stressz ellen<sup>37</sup>. A különböző reaktív oxigén származékok ugyanis nagyobb készséggel reagálnak a perszulfidokkal, mint a szabad tiolcsoportokkal, az ennek során keletkező oxidatív termékek (pertioszulfénsavak:

P–CySSOH, pertioszulfinsavak: P–CySSO<sub>2</sub>H és pertioszulfonsavak: P–CySSO<sub>3</sub>H) pedig diszulfid (S–S) hídjukon keresztül visszaredukálhatók az eredeti tiollá, ellenben a tiolok irreverzibilis oxidációja során keletkező módosulatokkal (szulfinsavak: P–CySO<sub>2</sub>H, szulfonsavak: P–CySO<sub>3</sub>H)<sup>31,37</sup>.

A perszulfidképződés mechanizmusára több javaslat is ismeretes a szakirodalomban. Ciszteinből szulfid és valamilyen oxidatív folyamat együttes hatására keletkezhetnek cisztein per- és polisulfidok. A cisztein–perszulfidok nem enzimátikus termelődését illetően korábban a redukált cisztein oldalláncok szulfiddal való direkt reakcióját tartották felelősnek ennek a módosulatnak a kialakulásáért<sup>41</sup>, azonban ez a kölcsönhatás nem játszódhat le, tekintve hogy a kénatom oxidációs állapota –2 mind a Cys oldalláncokban, mind a szulfidban, így nem lehetnek egymás redox partnerei<sup>45,46</sup>. Ennek megfelelően mára már elfogadott, hogy poszttranszlációs perszulfidképződés oxidált Cys módosulatok és szulfid közötti reakció, vagy a kénhidrogén oxidációs termékeinek Cys tiolokkal való kölcsönhatása révén valósulhat meg. Az irodalomban jelenleg elfogadott útvonalakat a 4. ábra foglalja össze<sup>24</sup>:



**4. ábra:** A fehérje perszulfidok nem enzimátikus képződésére javasolt mechanizmusok (Az ábrát P. Nagy et al. Biochim Biophys Acta (2014)<sup>24</sup> alapján készítettem)

Fehérje perszulfidképződéshez vezet a tiolok oxidált módosulatainak, a cisztein–szulfénsavaknak szulfiddal való reakciója (A). A szakirodalomból ismeretes, hogy sejtes rendszerekben több tiolfehérje szulfenilált állapotban detektálható<sup>47,48</sup>, melyek tiol nukleofilekkel rendkívül reaktívak, így szulfiddal való reakciójuk végbemenetele valószínű, és

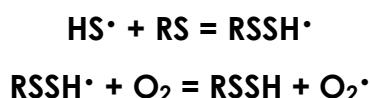


a megfelelő fehérje perszulfidhoz vezet. A szulfénsavak stabilitását sztérikus tényezők befolyásolhatják<sup>45</sup>, a szulfid azonban kis méretének köszönhetően az alifás tioloknál jóval könnyebben hozzáfér és reagál ezen oxidált módosulatokkal a cisztein analógiájára<sup>49,50</sup>.

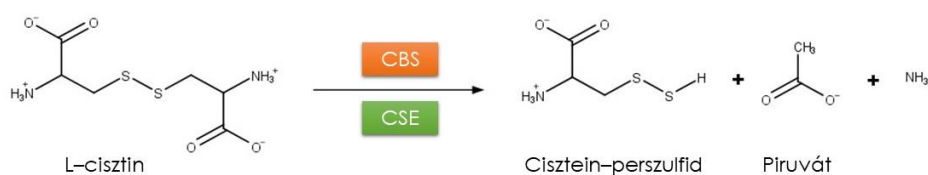
A fehérje–diszulfidok szulfiddal való redukciója **(B)** kémiai szempontból lehetséges<sup>36,51,52</sup>, a reakciók valószínűsége pedig termodinamikai és kinetikai szempontból a diszulfid alegység reaktivitásának függvénye<sup>53</sup>. Egyes aktivált funkcionális diszulfidok (tioredoxin, oxidoreduktázok) gyorsan redukálódnak perszulfid intermedieren keresztül<sup>7</sup>, illetve oxidáló környezetben (endoplazmatikus retikulum, mitokondrium) a reaktív diszulfidok reakciója jóval valószínűbb<sup>53</sup>.

Oxidált szulfid származékok és cisztein tiolok reakcióját **(C)** figyelték meg a *foszfatáz–tenzin homológ enzim (PTEN)* és a *redox érzékeny zöld fluoreszcens fehérje (roGFP)* esetében<sup>31</sup>. A polisulfidok oxidálhatják a funkcionális cisztein oldalláncokat, perszulfidált illetve polisulfidált köztitermékek kialakulását eredményezve. Ezen modell tekintetében a ciszteinek relatív reaktivitása feltehetően nagyfokú kinetikai szelektivitáshoz vezet biológiai rendszerekben<sup>54</sup>.

Egy további lehetséges mechanizmus a gyökös útvonalon történő perszulfidképződés. A tiolok egyelektronos oxidációja tiilgyököket eredményez<sup>55</sup>, melyek egy fehérje tiollal reagálva diszulfid gyökániont képeznek. Ez egy második lépésben molekuláris oxigénnel perszulfidot és szuperoxidot adhat az alábbi modell szerint:

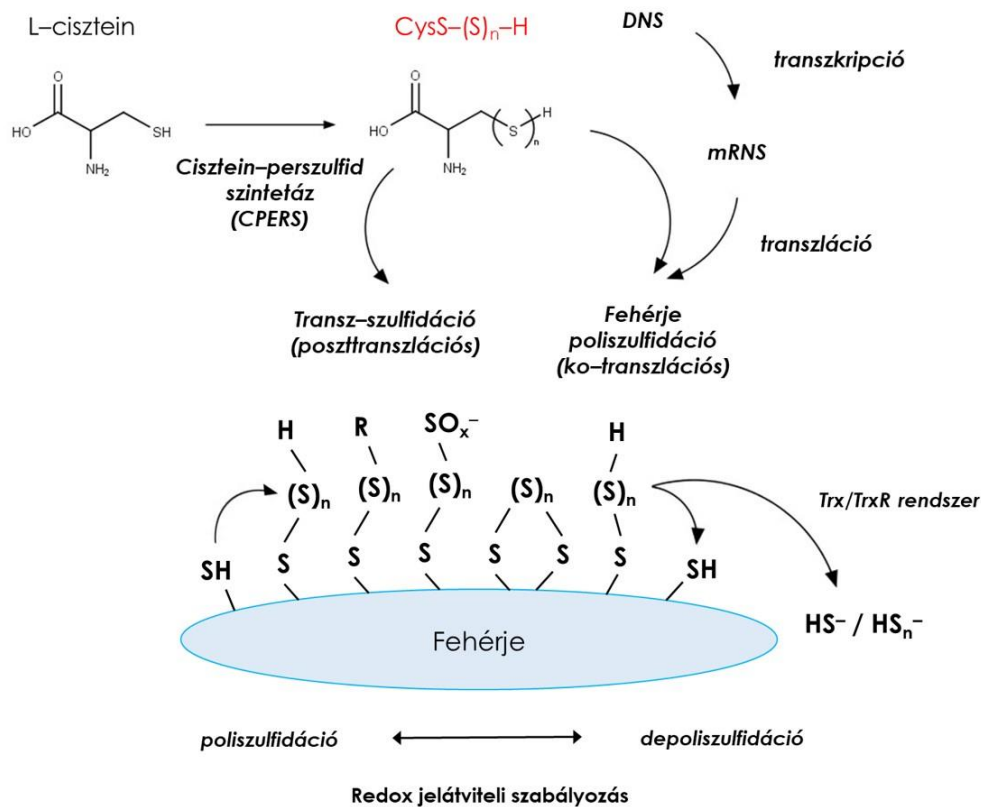


Enzimatis utak tekintetében a szulfid bioszintéziséért felelős transzszulfurációs enzimek (CBS, CSE) tevékenysége szulfid jelenlététől függetlenül is eredményezhet közvetlen perszulfidtermelést<sup>14</sup> (5. ábra). Enzimkinetikai számítások eredményei azonban arra engedtek következtetni, hogy sejten belül nem utóbbi reakcióutak a fő perszulfidtermelő folyamatok, hanem a CBS és CSE szulfidtermelése és a szulfid által kiváltott fehérje perszulfidáció sokkal inkább meghatározó<sup>10</sup>. Ennek ellenére meglepő módon, CBS és CSE hiányos egerekben számottevő mennyiségű cisztein–perszulfidot detektáltak, amely eredmény azt sugallja, hogy valamilyen alternatív útvonal is szolgáltathatja ezeket a módosulatokat<sup>56</sup>.



**5. ábra:** Cisztein–perszulfid képződése cisztinből, CBS és CSE által katalizált útvonalon

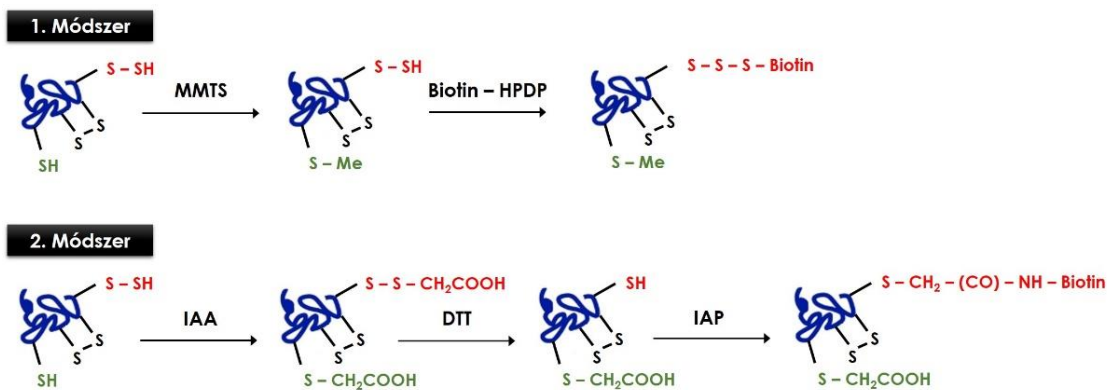
Akaike és munkatársai a közelmúltban újonnan azonosított funkciójára alapján a *ciszteinil-tRNS szintetáz* (CARS) javasolták, mint fő perszulfidtermelő enzimet. Ez az enzim ciszteint használ szubsztrátként, valamint alacsony  $K_M$  és magas  $k_{cat}$  értéke is arra enged következtetni, hogy fiziológiás körülmények között, szulfid jelenlétét nem igényelve rendkívül effektív perszulfidképző (*cysteine persulfide synthase* (CPERS)). A ciszteineken történő direkt perszulfidképzés mellett az enzim kanonikus funkciója (CARS) a ciszteinek transzfer RNS-hez való kapcsolása. Javaslataink szerint azonban a ciszteinekből a másik, CPERS enzimaktivitása révén generált cisztein perszulfid a ciszteinnél jobb szubsztrát a tRNS-hez való kapcsolási reakció tekintetében, melynek következtében a tRNS a cisztein–perszulfidokat szállítja a riboszómába, hogy beépüljenek az újonnan szintetizált polipeptid láncokba (6. ábra). Ez a felfedezés rendkívül nagy áttörést jelent a perszulfidképződés terén, ugyanis azt sugallja, hogy fehérje perszulfidok nem csak poszttranszlációs, hanem transzlációs úton is keletkezhetnek<sup>56</sup>. Ezek fényében javaslatunk szerint a CBS és CSE általi perszulfidtermelés inkább patológiás körülmények között lehet domináns, ugyanis azok sok esetben emelkedett cisztin vagy CBS/CSE szintet eredményeznek.



**6. ábra:** Cisztein–perszulfid képződése ciszteiből, CARS2 által katalizált útvonalon  
(Az ábrát Akaike et al. Nat Comm (2017)<sup>56</sup> alapján készítettem)

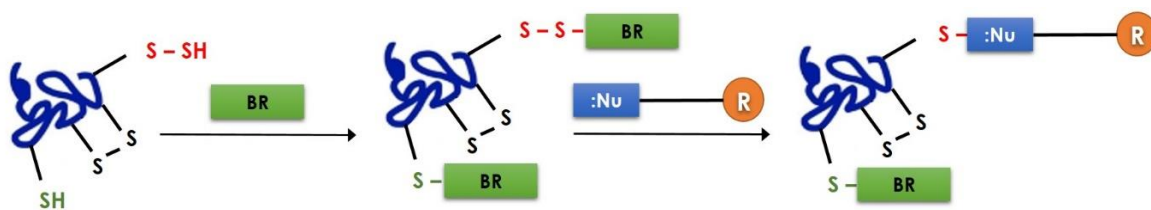
### 2.3. Cisztein per- és polyszulfidok detektálása

A cisztein per- és polyszulfidok sejtes rendszerekben és szövetekben detektált számottevő mennyisége és enzimaktivitást vezérlő tulajdonsága rávilágított ezen módosulatok kulcsfontosságú szerepére jelátviteli utak szabályozásában<sup>9,37,57,58</sup>. Ennek ellenére a szakirodalomban számos kérdéssel illetve ellentmondással találkozhatunk, melynek fő oka az egyes jelátviteli mechanizmusok tisztázatlansága. A redoxireakciók szabályozó szerepe mára már nem kérdéses, azonban a hiányos ismeretek legfőbb oka, hogy ezen reaktív kén származékok detektálása és megbízható analízise komoly kihívást jelent, a jelenleg széles körben alkalmazott eljárások pedig számos korláttal bírnak. Az elmúlt években több módszer kifejlesztése irányult a polyszulfidált cisztein származékok detektálására. Ezek közül az első a Mustafa és munkatársai által kifejlesztett, módosított biotin–switch technika volt<sup>41</sup>, melynek lényegét a 7. ábrán bemutatott 1. módszer foglalja össze:



**7. ábra:** A biotin-switch technika sematikus modellje  
(Az ábrát Zhang et al Angew Chem (2014)<sup>59</sup> alapján készítettem)

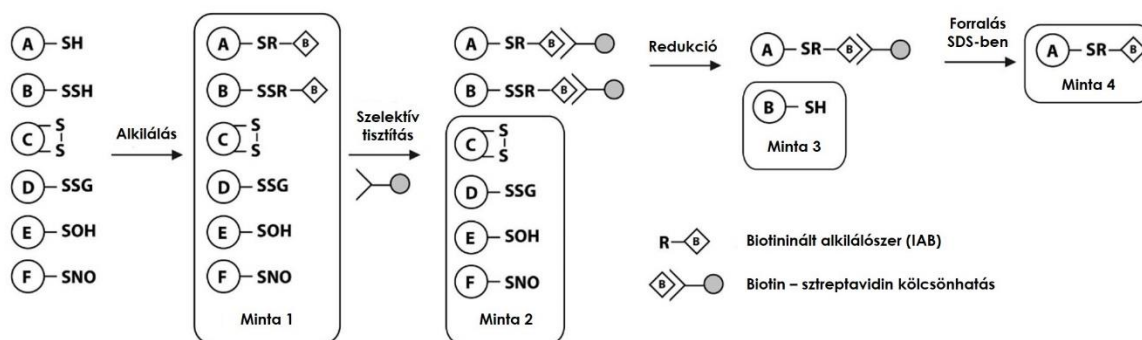
A módszer első lépése a tiolok (–SH) metil-metán-tioszulfonáttal (MMTS) történő szelektív blokkolása, melynek következtében a következő lépésben csak a perszulfid funkciós csoport (–SSH) fog konjugálódni az N-[6-(biotinamido)hexil]-3’-(2’-piridil-ditio)propionamid (biotin–HPDP) reagenssel. Egy másik kutatócsoport egy ettől eltérő módszert javasolt (2. módszer)<sup>43</sup>, amely szerint a tiolok és perszulfidok jódecetsavas (IAA) jelölését követően egy D,L-ditiotreitollal (DTT) történő redukciós lépésben a perszulfidból képzett diszulfid származék szelektíven visszaredukálható tiollá és jelölhető a jódacetil–PEG2–biotin származékkal (IAP), míg a tiolok jelölése során keletkező tioéter származék rendkívül stabil, így nem redukálható. Kémiai szempontból mindkét eljárásnak vannak határai főként a szelektivitást illetően, amelyre később több tanulmányban is rámutattak. Különösen fiziológiás pH-n, a fehérje perszulfidok a tioloknál is jobb nukleofilek, így az alkilálószerekkel, köztük az 1. módszer során alkalmazott MMTS-sel is gyorsabban reagálnak, számos fals negatív eredményt adva. Továbbá, a 2. módszerben redukálószerként alkalmazott DTT a perszulfidok mellett a diszulfid hidakat is redukálja, amely fals pozitív eredményekhez vezet. Ennek elkerülése illetve minimalizálása érdekében Zhang és munkatársai kidolgozták az úgynevezett „tag switch” módszert<sup>59</sup>, melynek elvi alapját a 8. ábra szemlélteti:



**8. ábra:** A „tag-switch” technika sematikus modellje  
(Az ábrát Zhang et al Angew Chem (2014)<sup>59</sup> alapján készítettem)

Első lépésben egy úgynevezett „SH blokkoló” reagenssel (BR) jelölték meg a tiol és perszulfid csoportokat. Az így kapott köztitermékben a perszulfid addukt diszulfid kötésének nukleofilekkel szembeni megnövekedett reaktivitását kiaknázva, egy úgynevezett „tag switching” reagenssel (mely egyrészt nukleofil karakterű, másrészt tartalmazza a specifikus jelzőmolekulát (R), pl. biotin) specifikusan jelölhető a perszulfidból képzett addukt. A tiolok jelölése során a már előbb említett stabil tioéter származék keletkezik, melynek további reakciója nem valószínű. A módszer egyik rendkívül nagy korlátját jelenti, hogy az „SH blokkoló” reagensként alkalmazott metilszulfonil–benzotiazol nem sejtp permeábilis, így intakt sejtekben nem teszi lehetővé a perszulfidok detektálását. Másrészt a második, hasítási lépés során a jelölt perszulfidok mellett az aktivált funkcionális diszulfidok is reagálhatnak, amely számos fals pozitív eredményt szolgáltat. Az újabb eljárások kifejlesztése során ezen szelektivitási problémák kiküszöbölését, illetve a perszulfidok intakt sejtekben való detektálásának lehetőségét tűzték ki célul.

A switch technikákat követően kutatócsoportunk kifejlesztette a fehérje–perszulfidok specifikus detektálására alkalmas ProPerDP eljárást<sup>7,60</sup>, amelynek nagy előnye, hogy a korábbiakkal ellentétben intakt sejtekből és szövetmintákból is alkalmas a fehérje–perszulfid koncentráció meghatározására (9. ábra).

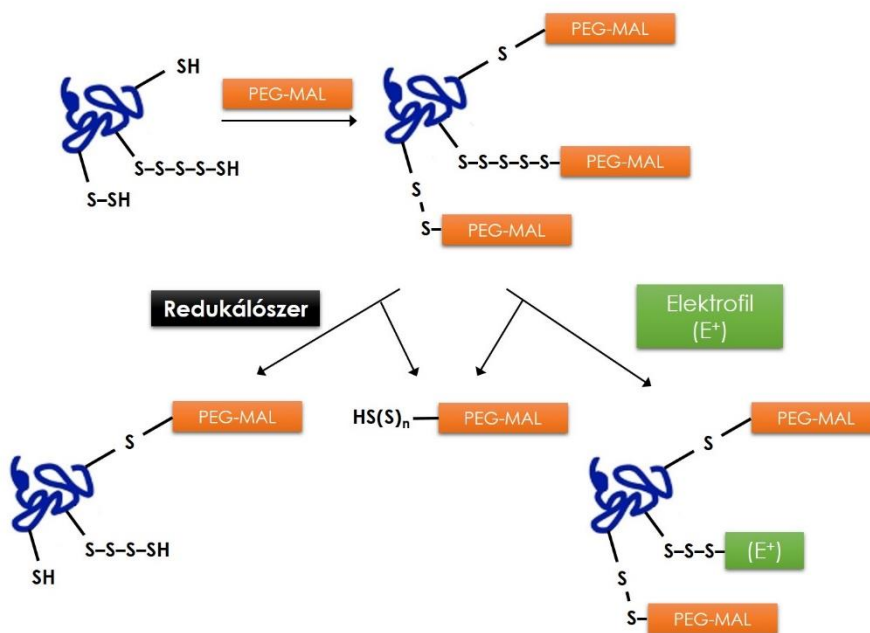


### 9. ábra: a ProPerDP eljárás sematikus modellje<sup>7</sup>

(Az ábrát az E. Doka et al Sci Adv (2016)<sup>7</sup> közlemény tartalmazza)

A módszer első lépése a tiol és perszulfid csoportok jódacetil-PEG2-biotinnal (IAB) történő alkilálása, majd ezt követi a keletkező tioéter és vegyes diszulfid adduktok sztreptavidinnel bevont mágneses gyöngyökkel való specifikus kihúzása a reakcióelegyből. A perszulfidált fehérjékből képzett származékok a következő, redukciós lépésben hasíthatók le a mágneses gyöngyökről és jeleníthetők meg gélelektroforézist követően, míg a tiolokból képzett stabil tioéter származékok nem redukálhatók, így a gyöngyökhöz kötve maradnak és csak SDS-es főzést követően detektálhatók SDS-PAGE gélen.

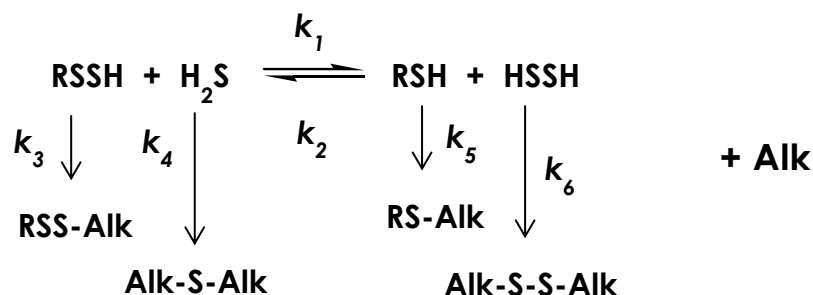
A ProPerDP-vel közel egyidőben több tanulmány is megjelent újonnan kifejlesztett eljárásokról, amelyek hasonló megközelítésből teszik lehetővé a fehérje-perszulfidok szelektív detektálását<sup>61,62</sup>, majd Akaike és munkatársai a közelmúltban fejlesztették ki az úgynevezett PMSA eljárást<sup>56</sup>, melynek alapja a poliszulfid láncok elektrofil ágensekkel történő hasítása (10. ábra). A módszer első lépése a poliszulfidált oldalláncok biotin-PEG-maleimides jelölése, amely megváltoztatja a fehérje méretét, így elektroforetikus elválasztás során a poliszulfidáltsági fok függvényében a hozzá tartozó sáv helyzete megváltozik. Ha a jelölést követően különböző elektrofil ágensekkel kezeljük a jelölt fehérjét, a biotin-PEG-maleimid láncok lehasíthatók, a gélen detektált sávok pedig tükrözik az alkilálószer természetét. A módszer így egyrészt alkalmas a fehérjék poliszulfidáltsági fokának megállapítására, másrészt pedig az egyes alkilálószernek elektrofilicitásáról is információt ad.



**10. ábra:** A PMSA eljárás sematikus modellje

(Az ábrát Akaike et al Nat Comm (2017)<sup>56</sup> alapján készítettem)

Az előbb említett eljárások közös tulajdonsága, hogy mindegyikük a tiolok és poliszulfidok elektrofil jelölésén alapszik, melynek következtében relatíve stabil tioéter, illetve dialkil-poliszulfid származékokat generálva mintegy „befagyasztjuk” a reaktív kénszármazékok között végbemenő dinamikus egyensúlyi redoxireakciókat. Egy ilyen, reaktív kénszármazékok közötti egyensúlyt, valamint a detektálás során végbemenő jelölési reakciókat szemléltet a 11. ábra:



**11. ábra:** Példa a reaktív kénszármazékok közötti dinamikus egyensúlyi folyamatokra, valamint a detektálás során alkalmazott alkilálási reakciókra<sup>5</sup>

Kémiai szempontból azonban a kapott eredményeket rendkívül körültekintően kell elemezni, ugyanis várható, hogy a poliszulfidok elektrofil jelölése úgynevezett Curtin–Hammett kontroll alatt áll<sup>63</sup>. Eszerint, ha ezek a részecskék dinamikus redox egyensúlyban vannak egymással, akkor a különböző alkilált származékok mennyisége és aránya a valós egyensúlyi viszonyok helyett az elektrofil jelölés sebességét fogja tükrözni a részecskék gyors egymásba alakulásainak következtében. Tehát, az alkilált poliszulfidok mennyisége a valós egyensúlyi koncentrációk helyett inkább az alkilálási reakciók sebességére enged következní. Éppen ezért, a kezdeti alkilálási lépés rendkívül kritikus és az előbb említett jelenség miatt fontos hogy gyorsabban végbemenjen, mint a reaktív kénszármazékok interkonverziója. Azonban a kísérleti körülmények (hőmérséklet, pH) mellett ezeknek a folyamatoknak a relatív sebességét számos paraméter befolyásolja, úgy mint az alkilálószer minősége, koncentrációja, vagy éppen a sejtek permeabilitása. Habár a redox biológiai irodalom nagy része még eltekint a jelenségtől, néhány közleményben már felhívták a figyelmet az alkilálási folyamatok lassúságából adódó detektálási problémákra: az alkilálást megelőző, savas körülmények között végrehajtott sejtlízis vagy szövethomogenizáció nem bizonyult elégségésnek a tiolok redox reakcióinak lassításához, ellenben számos nemkívánatos redoxireakciót indukált. Ez vezetett el a sejtpermeabilis alkilálószer alkalmazásához (N–etil–maleimid, jódacetamid, S–metil–metántioszulfonát), azonban peroxidoxinok vizsgálata során sejtpermeabilis alkilálószer alkalmazása esetén is megfigyelték, hogy mind az ágens minősége, mind koncentrációja számottevően befolyásolja a tiolok detektált oxidációs állapotát<sup>64, 65</sup>. Ezt követően egy átfogó tanulmányban, mechanisztikus megközelítésből vizsgáltuk meg az alkilálási lépést, és nagyszámú kísérleti adattal szemléltettük annak hatását a poliszulfidok detektálására vonatkozóan. Kísérleteink során több modellrendszeren (cisztein, glutation, fehérje–poliszulfidok) tanulmányoztuk a poliszulfid származékok speciációját. Az alkilálási reakciók speciációra gyakorolt hatását vizsgáltuk az idő- és koncentrációfüggés tekintetében három ágens: a  $\beta$ -(4-hidroxifenil)etil-jódacetamid (HPE–IAM), a monobromobimán (MBB) és az N–etilmaleimid (NEM) esetén. Megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy az alkilálószer mennyisége és minősége jelentősen befolyásolja a specieszek eloszlását. Ennek oka egyrészt a 11. ábrán szemléltetett egyensúlyi reakciók eltolása, másrészt pedig a poliszulfid láncok hasítása. Az egyensúlyi reakciók eltolása sokkal lényegesebb lehet bizonyos részecskékre specifikus alkilálószer alkalmazása esetén, ugyanis ekkor a specifikus jelölés következtében az egyensúlyok eltolása a detektálni kívánt részecske koncentrációjának túlbecsüléséhez vezet. Ilyen specifikus alkilálószer a dimedon, amely a szulfénsav (–S–OH)

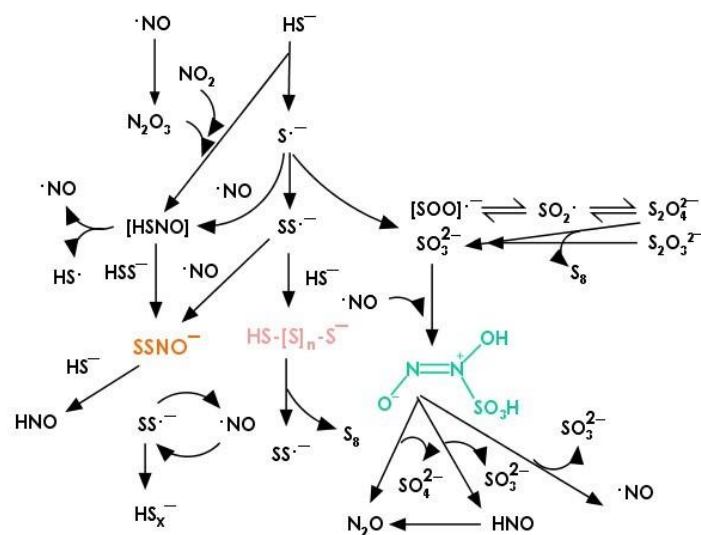


módosulatok specifikus jelölésére alkalmas. Egy korábbi tanulmányban megmutattuk, hogy a szulfénsavak mellett a dimedon a per- és politioszulfénsav formákkal is reagál, melyek biológiai rendszerekben oxidáció vagy a hidrolitikus egyensúlyok eltolása által keletkezhetnek. Kísérleteim során arra a következtetésre jutottam, hogy a dimedon biológiailag releváns rendszerben való alkalmazása a szulfénsav forma túlbecsülését eredményezheti az előbb említett reakciók következtében. Megfigyeléseim összhangban állnak korábbi javaslatunkkal, amely szerint a detektálási eljárások során a szabad formában jelenlévő szulfid irreverzibilis származékképzése a biológiai raktárakban kötött szulfid felszabadítása felé fogja eltolni az egyensúlyi reakciókat<sup>24</sup>. Az említett kísérleteket és azok eredményeit a disszertáció további részében kívánom részletesen ismertetni.

#### **2.4. A kénhidrogén és a nitrogén–monoxid által vezérelt jelátvitel összefonódása, nitrozoperszulfid mint az NO–szulfid kölcsönhatás egyik kulcsfontosságú köztiterméke**

Ahogy már a bevezetőben is említettem, mind a kénhidrogén, mind a nitrogén–monoxid a kis jelátviteli molekulák közé tartozik, az élő szervezetben belül pedig nagyrészt biomolekulákhoz kötött formában található meg. A NO nitrozotiolok formájában, míg a kénhidrogén szulfán kén formájában tárolódhat illetve szállítható, majd adott stimulus hatására szabadulnak fel és vesznek részt azon jelátviteli folyamatokban, ahol szükség van az általuk kifejtett szabályozó hatásra<sup>66</sup>. A közelmúltban több kutatás eredménye rávilágított, hogy a két kismolekula hasonló fiziológias aktivitással rendelkezik, úgy mint az erek tágítása, ezáltal pedig a vérnyomás szabályozása, vagy az angiogenezis. Kimura és munkatársai már a 2000-es évek előtt javaslatot tettek a két molekula kooperatív működésére, amely a simaizomsejtek relaxációján keresztül valósulhat meg<sup>67</sup>. Ez a jelenség többek között arra enged következtetni, hogy a két részecske által vezérelt jelátviteli utak is találkozhatnak, illetve összefonódhatnak. Ezt Wang is alátámasztotta, állítása szerint ugyanis a szulfid számos fiziológias hatása a sejt típus és koncentráció mellett a nitrogén–monoxid vagy annak bioszintéziséért felelős enzimek jelenlététől is függ<sup>68</sup>. Ezt követően számos kísérlet szolgáltatott bizonyítékot arra, hogy a NO és a szulfid kölcsönösen szabályozza a másik bioszintéziséért felelős enzimek működését és aktivitását: továbbá mindkét molekula hathat ugyanazon jelátviteli út fehérjéire. Mára már elfogadott, hogy a NO és H<sub>2</sub>S által vezérelt útvonalak közül több is szorosan kapcsolódik

egymáshoz, valamint bizonyos szövetekben a bioszintézisért felelős enzimek együtt lokalizálódnak. Ez lehetőséget ad a két részecske azonos helyen és időben történő felszabadulására, így közvetlen kölcsönhatására, melyet azóta számos kutatás eredménye igazolt. Moore és munkatársai szerint az alacsony dózisu kénhidrogén által kiváltott érszűkítő és vérnyomásnövelő hatás a nitrogén-monoxiddal való közvetlen kölcsönhatás eredménye<sup>69</sup>, melynek során egy bioaktív részecske, feltehetően egy nitrozotiol keletkezik. Whiteman és munkatársai kezdetben tiosalétromossavként (HSNO) azonosították ezt a köztiterméket<sup>70</sup>, majd ezt követően Filipovic és kollégái nitrozotiolok és szulfid reakcióját tanulmányozva HSNO képződéséről számoltak be<sup>71</sup>. Az általuk javasolt modell szerint, a HSNO hasadása  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}^\bullet$  és  $\text{NO}^-$  felszabadulásához, ezáltal pedig a sejten belüli transznitrozálási reakciók elősegítéséhez vezet, így a HSNO-t jelátviteli utakban résztvevő kulcsfontosságú részecskeként azonosították. Ezzel ellentétben, kutatócsoportunk illetve több külföldi munkatársunk eredményei is megerősítették, hogy ez a részecske rendkívül instabil<sup>6,72-75</sup> és igen hajlamos homolízisre, valamint izomerizációs és polimerizációs reakciókra<sup>76-81</sup>, amely megkérdőjelezi jelátviteli utakban való részvételét<sup>82,83</sup>. A korábbiakban már több részletes tanulmányban ismertették, hogy a nitrogén-monoxid donorok és szulfid közötti direkt kémiai kölcsönhatás bonyolult és egymással összefonódó kémiai reakciók sorozatához vezet, melyek többek között nitrozoperszulfid ( $\text{SSNO}^-$ ), valamint egyéb bioaktív részecskék (SULFI/NO, szervesetlen poliszulfidok) felhalmozódását eredményezik<sup>6</sup> (12. ábra):



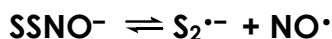
**12. ábra:** A kénhidrogén és a nitrogén-monoxid kémiai kölcsönhatása során lejátszódó reakciókra javasolt modell

(Az ábrát Cortese-Krott et al Proc Natl Acad Sci USA (2015)<sup>6</sup> alapján készítettem)

A közelmúltban több tanulmányban is az SSNO<sup>-</sup>-t javasolták a NO és szulfid által vezérelt jelátviteli utak közötti kommunikációért felelős jelátvivő molekulaként<sup>6, 82-86</sup>. Fiziológias pH-n, NO donorok és feleslegben lévő szulfid jelenlétében megfigyelhető felhalmozódása, valamint tiolok (GSH, CySH, DTT) jelenlétében stabil, amely jelenség egyébként igen meglepő egy perszulfid származék esetében<sup>6,82,83</sup>. Ezzel szemben Wedmann és munkatársai a nitrozoperszulfid bisz(trifenilfoszfin)–iminium sójának (PNP<sup>+</sup>SSNO<sup>-</sup>) kémiai tulajdonságait vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a nitrozoperszulfid fiziológias körülmények között nem stabil, H<sub>2</sub>S, glutation és cianid jelenlétében pedig gyorsan elbomlik, tionitrit (SNO<sup>-</sup>) felszabadulását eredményezve<sup>87</sup>.

Doktori kutatásom jelentős részében a nitrozoperszulfid kémiai és biokémiai tulajdonságainak tanulmányozására fókuszáltam. Kísérleteim eredményei korábbi közleményeinkkel egyetértésben alátámasztották az SSNO<sup>-</sup> stabilitását vizes közegben, redukáló körülmények között, továbbá a molekula potenciális bioaktivitására vonatkozóan is gyűjtöttem adatokat.

Az SSNO<sup>-</sup> előállítását és kémiai karakterizálását elsőként Seel és munkatársai végezték el az 1980-as években<sup>88-90</sup> szulfidot vagy polisulfidot reagáltatva NO-dal lúgos vizes oldatban, oxigénmentes körülmények között. Megfigyeléseik szerint az SSNO<sup>-</sup> állandó, dinamikus egyensúlyban van feltételezett prekuzoraival:



Ezt követően több kutatócsoport számos független kísérletben megerősítette, hogy a nitrozoperszulfid bomlása NO felszabadulásához vezet<sup>6,82,83,91</sup>, amely hatáson keresztül az SSNO<sup>-</sup> indirekt értágítóként és vérnyomáscsökkentőként funkcionálhat<sup>83,84</sup>. Fordított megközelítésből pedig, a sejtekben és szövetekben jelenlévő S<sub>2</sub><sup>•-</sup> és NO<sup>•</sup> reakciója SSNO<sup>-</sup> felhalmozódásához vezethet<sup>85</sup>.

A szakirodalomban már számos tanulmányban beszámoltak arról, hogy az SSNO<sup>-</sup> több fiziológias hatás tekintetében is potensebb effektor molekula, mint prekuzorai. A legtöbb közlemény a szív-, és érrendszeri hatásokról (érfalak tónusának szabályozása, vérnyomásszabályozás, pozitív inotróp hatás, simaizmok relaxációja) számol be, amely legtöbb esetben a lassú bomlás során felszabaduló nitrogén–monoxid általi sGC aktivációhoz rendelhető<sup>6, 82-84</sup>. Emellett azonban Cortese–Krott és munkatársai a közelmúltban rávilágítottak redox jelátviteli folyamatokban való részvételére is. Megfigyeléseik szerint az SSNO<sup>-</sup> alkalmazása aktiválja a *Keap-1/Nrf2* útvonalat, ezáltal pedig az oxidatív stresszre kiváltott válaszreakciók előidézésében lehet kulcsfontosságú szerepe<sup>86</sup>.

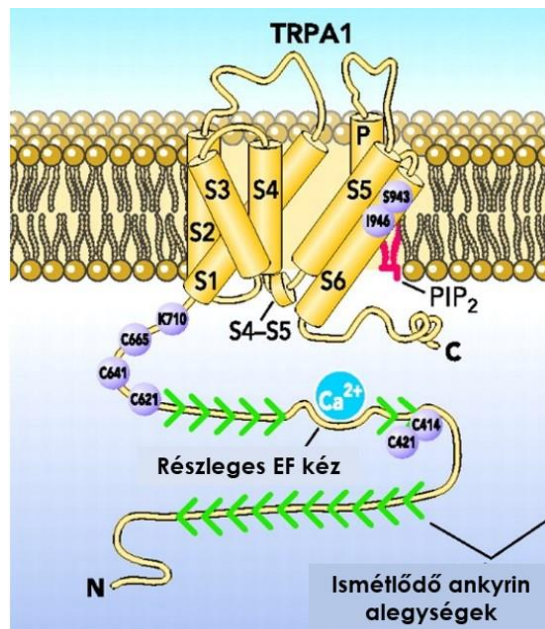
Mivel az  $SSNO^-$  a nitrozotiolok és feleslegben lévő szulfid reakciójának fő, számottevő stabilitással rendelkező köztiterméke, ezért potenciális jelölt lehet, mint a szulfid és NO vezérelt jelátviteli utak összefonódásáért felelős bioaktív molekula.

Feltételezésünk szerint az általa kiváltott potensebb hatás oka a kettős farmakológiai aktivitás, hiszen bomlása egyidejűleg vezet nitrogén-monoxid és szerves poliszulfidok felszabadulásához.

Utóbbi jelenség vizsgálatára a szakirodalomban egy saját közleményünktől eltekintve<sup>6</sup> nem találtunk példát, így doktori munkám során többek között a nitrozoperszulfid poliszulfid donor jellegét tanulmányoztam. Kísérleteim során több biológiailag releváns modellrendszeren (kis molekulatömegű tiolok, fehérjék, sejtrendszerek) is megmutattam, hogy a nitrozoperszulfid felelős lehet a cisztein oldalláncok közvetett poliszulfidációjáért, ezáltal valószínűsítve jelátviteli folyamatokban való részvételét és kulcsfontosságú szerepét.

## 2.5. Tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák és aktiválásuk

A TRPA1 ioncsatornák az elsőként azonosított tranziens receptor potenciállal rendelkező ioncsatornák, amelyek az érző neuronok 20–30%-ában lokalizálódnak.



13. ábra: A TRPA1 ioncsatornák szerkezeti felépítése

(Az ábrát a Bessac et al Physiology (Bethesda) (2008)<sup>92</sup> közlemény tartalmazza)

Többek között felelősek a fájdalom, hidegérzet és hőérzet kialakulásáért, a különböző mechanikus ingerek felvételéért és továbbításáért, illetve a neurogén gyulladási folyamatok kialakulásában is kulcsfontosságú szerepet játszanak. Szerkezetüket tekintve 15 ismétlődő ankyrin alegységet tartalmaznak Cys és Lys oldalláncokkal, amelyek kritikusak az agonisták által előidézett aktiváció során, ugyanis a rajtuk végbemenő kovalens módosítások váltják ki a receptorok aktivációját (13. ábra). Ez többek között  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  ionok beáramlásához vezet, melynek következtében a membrán depolarizálódik és a szenzoros neuronok aktiválódnak. A  $\text{Ca}^{2+}$  ionok koncentrációjának megnövekedése egyéb, kalcium függő jelátviteli utakat is indukál<sup>93</sup>, továbbá a szenzoros idegvégződésekben elhelyezkedő, CGRP-t tartalmazó vezikulák exocitózisának tekintetében<sup>94</sup>, valamint a receptorok funkciójának modulálásában<sup>95</sup> is meghatározó jelentőségű.

A receptor aktiváció és a kalcium-ionok megnövekedett szintje közötti összefüggés alapján a TRPA1 aktiváció tanulmányozására széles körben alkalmazott módszer az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint növekedésének követése, amely történhet mikroszkóp segítségével vagy áramlásos citometriával,  $\text{Ca}^{2+}$  érzékeny fluoreszcens festékek alkalmazása mellett. Ennél érzékenyebb meghatározásra kínál lehetőséget a radioaktív  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  izotóp felvételének vizsgálata vagy a patch clamp módszer<sup>95</sup>. Kísérleteink során áramlásos citometriával vizsgáltuk a receptort stabilan expresszáló sejtek  $\text{Ca}^{2+}$  szintjének növekedését, disszertáció a 4.2.5.3. fejezetében ismertett protokoll szerint.

Eberhardt és munkatársai javaslata szerint az NO és szulfid által vezérelt jelátviteli utak közötti kommunikáció egyik kiemelten fontos aspektusa a TRPA1 receptorok aktivációja, ugyanis az ioncsatorna cisztein tiol oldalláncai potenciális célpontot jelentenek a két jelátviteli molekula reakciójában keletkező bioaktív részecskék számára<sup>96</sup>. Az általuk javasolt modell szerint a receptorok aktivációjáért az NO–szulfid kölcsönhatás egyik köztiterméke, az instabil tiosalétromossav bomlása következtében felszabaduló nitroxil (HNO) felelős<sup>97,98</sup>. Eredményeik szerint a HNO általi TRPA1 aktiváció a ciszteinek közötti diszulfid kötések kialakításán keresztül valósul meg, és a receptor általi CGRP kibocsátásért is felelős. Ezt Miyamoto és munkatársai egy 2017-ben megjelent közleményben cáfolták<sup>8</sup>, ugyanis ők eredményeik alapján a szulfid és NO kölcsönhatás következtében keletkező szerves poliszulfidokat javasolták, mint TRPA1 aktiváló ágenseket. Doktori kutatásom során a receptorok nitrozoperszulfid általi közvetett és elnyújtott aktivációját tanulmányoztam.

### 3. Célkitűzések

A kénhidrogén fiziológiás jelentősége már nem vitatott, így napjainkban a nitrogén-monoxid és a szén-monoxid mellett a szulfidot is kis jelátviteli molekulaként tartják számon. A biológiai funkció kutatására fókuszáló tudományos közlemények tanulmányozásakor azonban sokszor ellentmondásokba ütközhetünk, amelynek oka az adott hatás kiváltásáért felelős molekuláris mechanizmusok hiányos ismerete. Doktori kutatómunkám célja a kénhidrogén által vezérelt jelátviteli folyamatok molekuláris mechanizmusainak tanulmányozása volt, amin belül a fehérje cisztein oldalláncok poliszulfidációjára fókuszáltam a következő pontok szerint:

1., Céлом volt elemezni a jelenleg széles körben alkalmazott detektálási eljárásokban közös alkilálási protokollokat, majd egy átfogó tanulmányban megvizsgálni azok előnyeit valamint hátrányait, és rávilágítani arra, hogy kémiai megközelítésből rendkívül fontos a kísérleti körülmények megválasztása (alkalmazott reagensek, koncentráció, inkubálási idő) annak érdekében, hogy a detektált módosulatok mennyisége a sejten belüli valós viszonyokat tükrözze.

2., A cisztein-poliszulfidok detektálásának vizsgálata és optimalizálása mellett további célként tűztem ki az alkilálási reakciók endogén egyensúlyokat befolyásoló hatásának tanulmányozását a fehérje-szulfénsavak dimedonos detektálására vonatkozóan, valamint az eddig tisztázatlan mechanizmusokból fakadó félreértések feloldását.

3., A kutatómunka további részében a ciszteinek poliszulfidációjának egy új útvonalára fókuszáltam, amely a kénhidrogén és a nitrogén-monoxid által vezérelt jelátviteli utak összefonódásához kapcsolódik. A két jelátviteli molekula kooperatív hatását már számos közleményben ismertették, amelyért több kutatócsoport javaslata és saját eredményeink alapján részben a két részecske kémiai kölcsönhatásai során keletkező köztitermék, a nitrozoperszulfid ( $SSNO^-$ ) lehet felelős. Kutatócsoportunkkal együttműködve, Cortese-Krott és munkatársai javasolták, hogy ez a részecske fiziológiás körülmények között számottevő stabilitással rendelkezik, lassú és folyamatos bomlása pedig nitrogén-monoxid és szerves poliszulfidok felszabadulásához vezet. Ezáltal feltételezhető, hogy bomlástermékei révén az  $SSNO^-$  a fehérje ciszteinek nitrozálása, valamint per- és poliszulfidációjára által vesz részt számos jelátviteli útvonalban.

4., Doktori kutatásom utolsó célkitűzése a ciszteinek nitrozoperszulfid általi per- és poliszulfidációjának tanulmányozása volt, melyet több modellrendszeren (glutacion, humán-

szérum–albumin, HEK sejtek, TRPA1 ioncsatornák) is megvizsgáltam annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerhessünk a kénhidrogén és nitrogén–monoxid által közösen vezérelt jelátviteli folyamatokba és jobban megérthessük azok molekuláris mechanizmusait.

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. Vegyszerek és oldatok

Kísérleteink során a legtisztább, analitikai minőségű vegyszerekkel dolgoztunk, melyeket vezető vegyipari cégektől vásároltunk (Sigma-Aldrich, Cayman Chemical, VWR Chemicals, Santa Cruz Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Nacalai Tesque, Wako Pure Chemical Industries, Invitrogen). A különböző összetételű poliszulfid sókat a Dojindo Laboratories biztosította számunkra. A rekombináns TrxR1 és TRP14 fehérjéket Prof. Elias Arnér munkatársunk biztosította a Karolinska Intézetből.

A szulfid törzsoldatok előállítását a szakirodalomban ismertetett módon történt<sup>24</sup>, szilárd  $\text{Na}_2\text{S}$  illetve  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  felhasználásával. A törzsoldatokat jégen, sötétben tároltuk, koncentrációjukat pedig kétféle módszerrel határoztuk meg<sup>24</sup>. A törzsoldatokat minden nap frissen készítettük, a munkaoldatokat pedig közvetlenül a mérések előtt hígítottuk a megfelelő pufferrel.

A poliszulfid törzsoldatokat MILLI-Q (Millipore) tisztítórendszerrel készített ultraszűrt vízben, vagy a kísérlet során alkalmazott pufferoldatban állítottuk elő szilárd technikai minőségű kálium-poliszulfid ( $\text{K}_2\text{S}_x$ ; különböző lánchosszúságú poliszulfidok keveréke), nátrium diszulfid ( $\text{Na}_2\text{S}_2$ ), nátrium triszulfid ( $\text{Na}_2\text{S}_3$ ) vagy nátrium tetraszulfid ( $\text{Na}_2\text{S}_4$ ) sók feloldásával. Az oldatokat mindig frissen, közvetlenül az adott kísérlet előtt állítottuk elő. A nitrozoperszulfid törzsoldatokat 1 mM S-nitrozo-N-acetil-DL-penicillamin (SNAP) vagy S-nitrozoglutation (GSNO) és 10 mM szulfid reakciójával készítettük, pontos koncentrációjuk meghatározása fotometriásan történt.

Kísérleteink során pufferoldatok készítésére az alábbi vegyszereket alkalmaztuk:  $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  és  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , trisz(hidroximetil)-aminometán (TRIS), ammónium-acetát ( $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ), ammónium-bikarbonát ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES), RIPA (10 mM Tris-HCl, 1% NP-40, 0,1% nátrium deoxikolát, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, pH 7.4).



## Felhasznált vegyszerek listája és forgalmazói

<b>Akrilamid</b>	Merck
<b>alkalikus-foszfátáz konjugált másodlagos antitest (Sigma A3687)</b>	Sigma–Aldrich
<b>Ammónium – perszulfát</b>	VWR
<b>anti HSA rabbit</b>	Sigma–Aldrich
<b>BCA Protein Assay Kit</b>	Thermo Fischer
<b>BCIP–NBT</b>	Merck
<b>biotin–PEG–maleimid</b>	Sigma–Aldrich
<b>Bradford reagens</b>	Bio-Rad
<b>BSA</b>	Sigma–Aldrich
<b>Colloidal Coomassie</b>	Bio-Rad
<b>dimedon</b>	Sigma–Aldrich
<b>DMEM</b>	Lonza
<b>DTPA</b>	Sigma–Aldrich
<b>DTT</b>	Sigma–Aldrich
<b>ecetsav</b>	Molar Chemicals
<b>etanol</b>	Molar Chemicals
<b>GAPDH</b>	Sigma–Aldrich
<b>glicin</b>	VWR
<b>glutation</b>	Sigma–Aldrich
<b>GSNO</b>	Sigma–Aldrich
<b>HCl</b>	Molar Chemicals
<b>HEPES</b>	Sigma–Aldrich
<b>hidrogén–peroxid</b>	Molar Chemicals
<b>HPE–IAM</b>	Santa Cruz
<b>HSA</b>	Sigma–Aldrich
<b>IAM</b>	VWR
<b>jódacetil–PEG–biotin</b>	Sigma–Aldrich
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	VWR
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	VWR
<b>KOH</b>	Molar Chemicals

<b>L-cisztein</b>	Sigma–Aldrich
<b>MBB</b>	Sigma–Aldrich
<b>metanol</b>	Merck
<b>Na<sub>2</sub>S</b>	Sigma–Aldrich
<b>Na<sub>2</sub>S • 9 H<sub>2</sub>O</b>	Sigma–Aldrich
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub></b>	Dojindo
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub></b>	Dojindo
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub></b>	Dojindo
<b>NaCl</b>	VWR
<b>NEM</b>	Sigma–Aldrich
<b>SDS</b>	Merck
<b>SNAP</b>	Thermo Fisher Scientific, Cayman Chemicals
<b>streptavidin coated magnetic beads</b>	Sigma–Aldrich
<b>TCEP</b>	Thermo Fischer
<b>TEMED</b>	Sigma–Aldrich
<b>triklóecetsav</b>	Sigma–Aldrich
<b>Tris</b>	Sigma–Aldrich
<b>Tween 20</b>	Sigma–Aldrich

## Oldatok receptjei

### Pufferoldatok:

100 mM Foszfát Puffer + 100  $\mu$ M DPTA (pH: 7,40) Végtérfogat: 100 ml

1.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM bemérni: 0,2722 g
2.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  80 mM bemérni: 1,393 g
3. DTPA 3,9335 mg

Térfogatot beállítani 100 ml-re, pH-t 7,40-re cc. KOH-dal

200 mM Tris/HCl Puffer + 100  $\mu$ M DPTA (pH: 7,40) Végtérfogat: 100 ml

1. TRIS 2,4228 g
2. DTPA 3,9335 mg

Térfogatot beállítani 100 ml-re, pH-t 7,40-re 1:1 HCl-dal

### 12% SDS-PAGE gélek készítéséhez szükséges oldatok:

2 M Tris-HCl: (pH: 8,8)

121,1 g Tris 500 ml desztillált vízben feloldva

0,5 M Tris-HCl: (pH: 6,8)

15,1 g Tris 250 ml desztillált vízben feloldva

10% APS:

1 g ammónium-persulfát 10 ml desztillált vízben feloldva

### Gélek receptje:

Elválasztó gél (2 gélhez):

1. 4,85 ml desztillált víz
2. 3 ml 40% akrilamid törzsoldat
3. 2 ml 2 M Tris-HCl (pH: 8,80)

4. 100  $\mu$ l 10% SDS
5. 50  $\mu$ l 10% friss APS
6. 15  $\mu$ l TEMED

Stacking gél (2 gélhez):

1. 3,15 ml desztillált víz
2. 0,5 ml 40% akrilamid törzsoldat
3. 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH: 6,80)
4. 50  $\mu$ l 10% SDS
5. 25  $\mu$ l 10% friss APS
6. 8  $\mu$ l TEMED

10x Futtató Puffer:

1. 30,3 g Tris (250 mM)
2. 144 g Glicin (1,92 M)
3. 10 g SDS (1%)

1 liter desztillált vízben feloldva

4x Feltöltő Puffer (nem redukáló)

10 ml-hez: 4 ml 100% glicerin  
4,8 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,80  
0,8 g SDS  
4 mg brómfenolkék  
1,2 ml desztvíz

Fixáló oldat (Colloidal Coomassie-hoz)

1. 40 % EtOH

2. 10 % Tömény (100%-os) ecetsav
3. 50 % Desztillált víz

10x Blottoló Puffer:

1. 30,3 g Tris (250 mM)
2. 144 g Glicin (1,92 M)

1 liter desztillált vízben feloldva

1x Blottoló Puffer: (25 mM Tris, 0,192 M glicin)

1. 100 ml 10x Blottoló Puffer
2. 200 ml metanol (20%)

Ezt kiegészíteni 1 literre desztillált vízzel

10x TBS Puffer: (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH: 7,50)

1. 30,25 g Tris
2. 43,80 g NaCl

500 ml desztillált vízben feloldva.

TTBS Puffer:

1. 50 ml 10x TBS Puffer kiegészíteni 500 ml-re
2. 250 µl Tween-20

3%-os Blokkoló Puffer:

3 g BSA 100 ml TTBS-ben oldva

## 4.2. Műszerek és módszerek

### 4.2.1. UV-látható (UV-Vis) spektrofotometria

A pontos koncentrációk meghatározásához az egyes reagensek/termékek abszorbanciáját a megfelelő elnyelési maximumon, BioTek Powerwave XS plate reader készülék segítségével rögzítettük, majd a megfelelő moláris abszorbanciák ( $\epsilon$ ) ismeretében számítottuk ki a pontos értékeket. Referenciaoldatként háromszorosan ultraszűrt vizet, vagy a megfelelő hígítóközeget (200 mM Tris/HCl pufferoldat, pH=7,40) alkalmaztuk. A tioredoxin és glutation rendszerek nitrozoperszulfid bomlására gyakorolt hatásának tanulmányozása szintén a BioTek Powerwave XS készüléken történt, 8x12 lyukú mikroplate-en, a kinetikai görbék 412 nm-en történő felvételével.

A nitrozoperszulfid bomlásának kinetikai analízisét Agilent Cary 8454 diódasoros spektrofotométeren végeztem, melynek során adott időközönként 1,00 cm úthosszú kvarcküvetékben rögzítettem a spektrumokat.

### 4.2.2. Szulfidkoncentráció meghatározása metilénkék módszerrel

A metilénkék módszer az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás a különböző oldatok és biológiai minták szulfidkoncentrációjának meghatározására. Kutatócsoportunk összefoglaló közleménye alapján ez a módszer kiválóan alkalmas pufferelt vizes oldatok szulfidtartalmának mérésére, azonban biológiai mintákban használata nem ajánlott<sup>24</sup>. A módszer alapja a szulfid és N,N-dimetil-p-feniléndiamin közötti,  $\text{FeCl}_3$  által katalizált reakció, melynek során metilénkék keletkezik. Kísérleteim során egyszerű pufferelt oldatokkal dolgoztam: 75  $\mu\text{l}$  mintát adtam 425  $\mu\text{l}$  desztillált víz és 250  $\mu\text{l}$  1 w/v% cink-acetát elegyéhez, hogy csapadékképzéssel elválasszam a szulfidot a mintában lévő egyéb kromofóroktól. Ezt követően 133  $\mu\text{l}$  N,N-dimetil-p-feniléndiamin oldatot (20 mM, 7,2 M HCl-ban oldva) és 133  $\mu\text{l}$   $\text{FeCl}_3$  oldatot (30 mM, 1,2 M HCl-ban oldva) adtam a reakcióelegyhez, majd 15 perces inkubálást követően a metilénkék karakterisztikus elnyelési hullámhosszán, 667 nm-en detektáltam az abszorbanciát. A pontos koncentrációkat előzetesen felvett kalibrációs egyenes alapján számítottam ki.

### 4.2.3. Szulfán kén tartalom meghatározása hideg cianolízissel

A leggyakrabban szervesetlen poliszulfidok meghatározására alkalmazott hideg cianolízis alapja a 0 vegyértékű, úgynevezett szulfán kénatomok nukleofil reagensek iránti megnövekedett reaktivitása<sup>31</sup>. Lúgos közegben, a cianid ionokkal ( $\text{CN}^-$ ) tiocianát anionokat képeznek ( $\text{SCN}^-$ ), amely reakció egyben a szulfán kénatomok karakterisztikus jellemzője.  $\text{FeCl}_3$  felesleg jelenlétében a tiocianát ionok vas(III)–tiocianát akvakomplexet képeznek ( $[\text{Fe}(\text{SCN})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ ), amely 460 nm-en karakterisztikus elnyeléssel rendelkezik.

Kísérleteim során 180  $\mu\text{l}$  mintához elszívófülke alatt 20  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  és 25  $\mu\text{l}$  0,5 M KCN oldatot adtam, majd szobahőmérsékleten ~20 percre inkubáltam a reakcióelegyet. Ezt követően 5  $\mu\text{l}$  37% formaldehiddel és 50  $\mu\text{l}$  Goldstein–reagenssel (62 mM  $\text{FeCl}_3$  18,38%  $\text{HNO}_3$ -ban oldva) szobahőmérsékleten legalább 15 percre inkubáltam a mintákat, majd 460 nm-en meghatároztam az abszorbanciát.

A pontos koncentrációkat előzetesen KSCN oldatokkal felvett kalibrációs egyenes alapján számítottam ki, ugyanis a reakció sztöchiometriája alapján a képződő ( $[\text{Fe}(\text{SCN})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ ) mennyisége, azaz a tiocianát ionok koncentrációja megegyezik a mintában lévő szulfán kén koncentrációval.

### 4.2.4. Tömegspektrometriával kombinált folyadékkromatográfia

A tömegspektrometriával kombinált folyadékkromatográfia az analitikai kémiai módszerek körébe tartozó technika, amely az analitokat a folyadékkromatográfias fizikai elválasztást követően tömegspektrometria általi tömeg/töltés hányados alapján detektálja. Az eljárás rendkívül népszerű és széles körben alkalmazott a kémiai analízis során, ugyanis a két módszer kapacitását ötvözve lehetőséget ad a többkomponensű rendszerek egyes alkotóinak szétválasztására, majd az egyes komponensek detektálására, mindezt nagy érzékenységgel és specificitással. A módszerrel szervesetlen, szerves és biokémiai minták elemzése is lehetséges, így számos területen alkalmazzák, mind a laboratóriumi, mind az ipari eljárások során.

#### 4.2.4.1. Szervesetlen poliszulfidok analízise

A jóacetamid (IAM) általi alkilálás szervesetlen poliszulfid oldatok speciációjára gyakorolt hatását elválasztási lépés nélkül, a szervesetlen poliszulfid oldatok elektroporlasztásos (ESI)

ionforrásba történő direkt infúzióját követően tanulmányoztuk százszoros hígítást követően, IAM hozzáadása előtt és után. Az oldatokat 8 µl/perc áramlási sebességgel, 1 percig áramoltattuk majd az ionizáció hatékonyságának növelése érdekében ammónium–acetát jelenlétében másodpercenként vettük fel a nagy felbontású spektrumokat Waters SYNAPT G2-Si ESI-TOF-MS készüléken.

A IAM-mal előzetesen alkilált poliszulfidok N–etilmaleimid (NEM) általi lánchasítását UHPLC-MS/MS módszerrel tanulmányoztuk, Xevo TQ-S detektorral kapcsolt Waters Acquity UPLC rendszer segítségével. A mozgó fázis 5 mM ammónium–acetát vizes oldatának (A), illetve 95% acetonitril és 5% víz elegyében készített oldatának (B) különböző arányú keveréke volt. Az elválasztást Acquity UPLC CSH C18 (1,7 µm), 2,1×100 mm kolonnán végeztük gradiens elúciót alkalmazva (5 percet követően 95% fokozatosan 40%-ra csökkentve az A eluens arányát, majd 1 perc múlva ismét 95%-ra növelve azt). Az áramlási sebesség 0,2 ml/perc, a kolonna hőmérséklete 30 °C, az injektálási térfogat pedig 5 µl volt. A porlasztófeszültség a mérés teljes ideje alatt 8 V volt, míg az ütközési energia NEM hozzáadása előtt 12 V, NEM hozzáadása után 14 V volt. Az alkilált poliszulfid származékokat tandem tömegspektrometriával azonosítottuk, mennyiségüket pedig a kiválasztott molekulaion egy specifikus fragmensének monitorozásával (single reaction monitoring, SRM mód) határoztuk meg.

#### **4.2.4.2. Poliszulfidált CySH és GSH módosulatok analízise**

Az alkilált CyS(S)<sub>n</sub> és GS(S)<sub>n</sub> adduktok 0,1% hangyasavban történő hígítása és a megfelelő belső sztenderdek hozzáadása után LC-ESI-MS/MS analízist hajtottunk végre Nexera UHPLC rendszerrel (Shimadzu) kapcsolt triple quadrupole (Q) LCMS-8050 tömegspektrométeren (Shimadzu). A perszulfid és poliszulfid származékok elválasztása Nexera UHPLC rendszeren, YMC-Triart C18 kolonnán (50×2,0 mm belső átmérő) történt. Eluensként 0,1% hangyasav vizes (A) és metanolos oldatát (B) használtuk lineáris gradiens mellett, 15 perc alatt 5%-ról 90%-ra növelve a B eluens arányát, 0,2 ml/perc áramlási sebesség mellett, 40 °C-on. Az alkilált poliszulfid származékokat tandem tömegspektrometriával azonosítottuk, mennyiségüket pedig SRM módban határoztuk meg.



#### 4.2.4.3. Poliszulfidált GAPDH–dimedon adduktok analízise

A dimedonnal jelölt poliszulfidált minták tripszines emésztését és triklórecetsavas kicsapását követően a felülúszót LC/MS-MS analízisnek vetettük alá, amely Thermo Ultimate 3000 HPLC rendszerrel kapcsolt Thermo LTQ-XL lineáris ioncsapda tömegspektrométeren történt. Az analízis során 50 µl mintát injektáltunk a Kinetex C18 kolonnára (50×2,1mm belső átmérő), majd gradiens elúciót végeztünk 0,1% hangyasav vizes (A) és metanolos oldatának (B) különböző összetételű elegyével, a B eluens mennyiségét 15 perc alatt 5%-ról egyenletesen 95%-ra növelve. A mérések végrehajtása pozitív ionizációs módban, a dimedon adduktok mennyiségi meghatározása pedig SRM módban történt.

#### 4.2.4.4. Poliszulfidált glutation – IAM adduktok analízise

A poliszulfidált GSH származékok előállítása 1 mM GSH ~300 µM SSNO<sup>-</sup>-val, illetve a hozzá tartozó kontroll oldattal való inkubálással történt 200 mM Tris/HCl pufferben (pH 7,40), szobahőmérsékleten. A reakcióelegyből 0, 30, 60 illetve 120 perc elteltével mintát vettem, majd 100 mM IAM-mal végeztem alkilálást a poliszulfidált származékok stabilizálása céljából szobahőmérsékleten, 30 percig. Az alkilált származékokat ezt követően UPLC-MS/MS analízisnek vetettük alá, melyet Waters Acquity UPLC rendszerrel kapcsolt Xevo TQ-S kvadrupól tömegspektrométeren (Waters) végeztünk. A származékok elválasztása 1,6 µm belső átmérőjű Modus 100x2,2 mm Aqua UPLC kolonnán (Chromatoraphy Direct) történt. Eluensként 5 mM ammónium–formiát vizes (A) és acetonitriles oldatát (B) használtuk lineáris gradiens mellett, 4,5 perc alatt 99%-ról 60%-ra, majd 0,5 perc alatt 0%-ra csökkentve az A eluens mennyiségét, melyet 1,5 perces ekvilibrálás követett. Az áramlási sebesség 0,2 ml/perc, az injektált térfogat 5 µl volt. Az alkilált poliszulfid származékokat tandem tömegspektrometriával azonosítottuk, mennyiségüket SRM módban határoztuk meg.

#### 4.2.4.5. Poliszulfidált és oxidált cisztein – dimedon adduktok analízise

A poliszulfidált CysSH származékok előállítása 100 µM CysSH és 300 µM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> inkubálásával történt 10 mM Tris/HCl pufferben (pH 7,40), szobahőmérsékleten, 5 percig. A poliszulfidált módosulatokat ezt követően 0–25 mM hidrogén–peroxiddal és 5 mM dimedonnal együttesen inkubáltuk 37 °C-on 3 óráig. Az adduktok 0,1% hangyasavban történő hígítása és a megfelelő belső sztenderdek hozzáadása után LC-ESI-MS/MS analízist hajtottunk végre Nexera UHPLC

rendszerrel (Shimadzu) kapcsolt triple quadrupole (Q) LCMS-8050 tömegspektrométeren (Shimadzu). A származékok elválasztása Nexera UHPLC rendszeren, YMC-Triart C18 kolonnán (50×2,0 mm belső átmérő) történt. Eluensként 0,1% hangyasav vizes (A) és metanolos oldatát (B) használtuk lineáris gradiens mellett, 15 perc alatt 5%-ról 90%-ra növelve az A eluens mennyiségét, 0,2 ml/perc áramlási sebesség mellett, 40 °C-on. A dimedon adduktok detektálása SRM módban történt.

#### **4.2.5. Poliszulfidált CySH és GSH minták alkilálása**

Az alkilálószerkekből (HPE-IAM, MBB és NEM) 1 M-os törzsoldatokat készítettünk DMSO-ban, melyek további hígítása a megfelelő vizes közegekben történt. A poliszulfidált CySH és GSH származékok előállítására 100 µM CySH illetve GSH és 300 µM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> inkubálásával történt 30 mM HEPES/KOH pufferben (pH 7,50), szobahőmérsékleten, 5 percig. A poliszulfidált módosulatokat ezt követően 0,1–10 mM alkilálószerrel (0,1; 0,5; 1,0; 5 és 10 mM HPE-IAM, MBB illetve NEM) inkubáltuk szobahőmérsékleten 30 percig, 60 percig, 3 óráig és 6 óráig.

#### **4.2.6. Fehérjeszintű vizsgálatok**

##### **4.2.6.1. Bradford és BCA eljárások**

A Bradford assay – amely az egyik legelterjedtebb fehérjemeghatározási módszer – alapja, hogy a Coomassie Brilliant Blue G-250 festék savas közegben elektrosztatikus és van der Waals kölcsönhatások révén kötődik a fehérjékhez, melynek következtében elnyelési maximuma 465-ről 595 nm-re tolódik el. A fehérjeminták pontos koncentrációjának meghatározásához 10 µl mintához 200 µl Bradford reagenst adtunk, majd 5 perces inkubálást követően meghatároztuk az abszorbanciát 595 nm-en, a minták pontos fehérjekoncentrációját pedig az előzetesen felvett kalibrációs egyenes alapján számítottuk ki.

A BCA, vagy bicinkoninsavas meghatározás azon alapul, hogy a fehérje a Cu<sup>2+</sup>-ionokat Cu<sup>+</sup>-ionokká redukálja, melyekkel a bicinkoninsav molekulái kelátkomplexet alkotnak, amely 562 nm-en karakterisztikus elnyelési sávval rendelkezik. A fehérjeminták pontos koncentrációjának meghatározásához 10 µl mintához 200 µl BCA reagenst adtunk, majd 20 perces inkubálást

követően meghatároztuk az abszorbanciát 562 nm-en, a minták pontos fehérjekoncentrációját pedig az előzetesen felvett kalibrációs egyenes alapján számítottuk ki.

#### **4.2.6.2. Glicerinaldehid–3–foszfát–dehidrogenáz minták készítése**

##### **Poliszulfidált GAPDH származékok dimedonos jelölése**

A fehérje előredukcióját (5 mM DTT, 4 °C, sötét, 30 perc), és pontos koncentrációjának meghatározását (Bradford módszer) követően a mintákat nagy dimedonfelesleg mellett (10 µM GAPDH:50 mM dimedon) 200 µM hidrogén–peroxiddal, illetve nátrium–diszulfiddal kezeltük szobahőmérsékleten, fénytől védve egy órán keresztül. A kezelés után a fehérjemintákat 14,4 mg/ml koncentrációjú pronázzsal emésztettük 37 °C-on 1 óráig, majd 50% triklórecetsavas denaturálás, vortexelés és centrifugálás után a felülúszót LC/MS analízisnek vetettük alá (Thermo LTQ-XL lineáris ioncsapdával kapcsolt Thermo Ultimate 3000 HPLC készülék), végül elvégeztük a poliszulfidált GAPDH–dimedon adduktok detektálását.

##### **PMSA**

Az eljárás elméleti háttérét a disszertáció 21. oldalán és a 10. ábrán ismertettem. A redukáló pufferben tárolt tisztított humán rekombináns GAPDH-t RIPA pufferrel előzetesen kondicionált PD SpinTrap G-25 oszlopon sómentesítettem a redukáló közeg eltávolítása végett. Ezt követően a fehérjemintákat 1 mM és 10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> illetve Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> hozzáadása után inkubáltam 37 °C-on 1 óráig, miután a poliszulfidok feleslegét egy újabb sómentesítési lépésben távolítottam el. A pontos fehérjekoncentrációt BCA módszerrel határoztam meg, majd a fehérjetartalom kiegyenlítése után a mintákat 2 mM biotin–PEG36–maleimid reagenssel inkubáltam 37 °C-on 1 óráig a poliszulfidált oldalláncok jelölése céljából. A mintákat a jelölést követően többféle elektrofil ágenssel kezeltem (3 mM IAM, MBB, NEM, DTNB) 37 °C-on 1 óráig, majd 95 °C-on forraltam 5 percig 2–merkaptóetanol jelenlétében/hiányában. A mintákat -20 °C-on tároltam, majd gélelektroforézis és Coomassie festés segítségével határoztam meg a GAPDH poliszulfidációjának mértékét, illetve az egyes elektrofil ágensek általi poliszulfid lánchasítás mértékét.

#### **4.2.6.3. Humán szérum albumin minták készítése ProPerDP eljárásához**

A fehérje előredukcióját (5 mM DTT, 4 °C, sötét, 30 perc), majd pontos koncentrációjának meghatározását (Bradford módszer) követően előzetesen elkészített és tisztított SSNO<sup>-</sup> illetve kontroll oldattal való kezelését szobahőmérsékleten, fénytől védve hajtottam végre egy órán keresztül. A két reakcióelegyből 0, 20, 40 és 60 percnél mintákat vettem, melyeket a poliszulfidált módosulatok stabilizálása végett 1 mM jódecetil-PEG-biotin (Sigma) hozzáadása után szobahőmérsékleten, fénytől védve inkubáltam egy órán keresztül. Az alkilálószer feleslegét sómentesítés (Zeba 7K MWCO oszlop, Thermo Scientific) és ultaszűrés (30 kDa Amicon mikrokoncentrátor, Merck) segítségével távolítottam el. A mintákban lévő biotinilált származékokat specifikusan kötöttem meg mágneses részecskeszeparátor (Dynal MPC-M) segítségével, miután a mintákat sztreptavidinnel bevont mágneses gyöngyökkel szobahőmérsékleten és rázóasztalon, 30 percig inkubáltam. A felülúszó eltávolítása után a gyöngyöket TBST-vel mostam a nem specifikus kölcsönhatások megszüntetése végett, majd a gyöngyöket 5 mM TCEP oldatban újraszuszpendálva inkubáltam szobahőmérsékleten, enyhe ráztatás mellett 30 percig. A felülúszót eltávolítottam és 4X SDS-PAGE feltöltőpufferben hígítottam (ez a frakció volt a számomra releváns minta), majd a gyöngyöket 1X SDS-PAGE feltöltőpufferben forraltam 95 °C-on 3 percig. A mintákat -20 °C-on tároltam a gélelektroforézis és western blot analízis végrehajtásáig.

#### **4.2.6.4. SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)**

Kísérleteim során a mintákból általában ~50 ng fehérjét tartalmazó mennyiséget vittem fel a 12%-os SDS-PAGE gélek kútjaiba, melyeket a 4.1. fejezetben található recept alapján készítettem. A futtatást 120 V-on végeztem körülbelül másfél órán keresztül, majd ezt követően végeztem el a Coomassie Brilliant Blue gélfestést, vagy a western blot eljárást.

#### **4.2.6.5. Coomassie Brilliant Blue gélfestés**

A Coomassie festés az egyik legáltalánosabb fehérjefestési módszer. A kereskedelmi forgalomban kapható festékek ionos illetve van der Waals kölcsönhatások révén lépnek kölcsönhatásba a gélben lévő fehérjékkel, így savas környezetben a sávok gyorsan és kényelmesen láthatóvá tehetők. Elektroforézist követően legalább 15 percig fixáltuk a géleket 40% etanol-10% ecetsav vizes oldatában, majd QC Colloidal Coomassie festőoldatba helyezve

(BioRad) inkubáltuk a sávok megjelenéséig, legalább 1 órán keresztül. A festék feleslegének eltávolítása és a háttér minimalizálása végett a géleket többszöri csere mellett desztillált vízben mostuk, amíg a háttér színe el nem tűnt és a festett sávok jól láthatóvá váltak.

#### **4.2.6.6. Western blot, előhívás**

A fehérjék specifikus detektálását western blot eljárással végeztük, melynek során a gélben lévő fehérjék polivinilidén–difluorid (PVDF) membránra történő transzfere után a membránokat a fehérjékre specifikus antitestekkel inkubáltuk, majd láthatóvá tettük a mintázatot. A blottolás során a membránt szorosan a géltre illesztettük, majd blottoló készülék (Bio–Rad) segítségével újabb elektroforézist hajtottunk végre a gél síkjára merőlegesen, 130 V-on, 90 percig. Feszültség hatására a gélből a fehérjék a membrán felszínére vándorolnak, így a membránon rögzíthetjük a gélben kialakult mintázatot. A blottolást követően a membránokat egy éjszakán keresztül 4 °C-on 3%-os BSA TBST-s oldatában blokkoltuk, majd másnap az elsődleges antitest (anti albumin, Sigma A0433, 1:10000 hígítás blokkolóban), majd alkalikus–foszfatáz konjugált másodlagos antitest (Sigma A3687, 1:10000 hígítás blokkolóban) oldatában inkubáltuk billegőasztalon, szobahőmérsékleten, egy órán keresztül. A két inkubálás között a membránt 3x10 percig mostuk TBST-ben, a nem specifikus kölcsönhatások megszüntetése végett. A fehérjemintázatot 5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát–nitro tetrazólium (BCIP–NBT) festékkel (Merck) tettük láthatóvá, majd a mintázat dokumentálását követően a mennyiségi kiértékelést Image J szoftverrel (National Institutes of Health) végeztük.

#### **4.2.7. Sejtkultúrák és kezelések**

##### **4.2.7.1. HEK293 sejtek és kezelésük**

Az American Type Culture Collection-tól (ATCC) vásárolt, majd a Karolinska Egyetemen Prof. Elias Arnér kutatócsoportja által stabilan transzfektált HEK293 sejteket fetális borjú szérummal (10%), L-glutaminnal, penicillinnel (100 U/ml), és sztreptomocinnel (100 mg/ml) kiegészített Dulbecco's-Modified Eagle Medium (DMEM)-ben tartottuk fent, 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett. Kezelés előtt a sejteket médiummal mostuk, majd 50 µM SSP4 (10 mM törzsoldat DMSO-ban, további hígítás DMEM-ben) oldattal inkubáltuk 37 °C-on, 30 percig. A festék feleslegének eltávolítása végett a sejteket kétszer mostuk a médiummal, majd 50 µM

tisztított SSNO<sup>-</sup> oldattal kezeltük, a fluoreszcencia időbeli változását pedig mikroszkóppal követtük.

#### **4.2.7.2. TRPA1 expresszálo és TRPA1 deficiens CHO sejtek és kezelésük**

Kísérleteink során a sejten belüli Ca<sup>2+</sup> szint növekedését tanulmányoztuk, amely a bevezetőben említettek alapján a receptorok aktivációjához rendelhető. Hogy igazoljuk, a kezelés hatására megemelkedett [Ca<sup>2+</sup>] szint specifikus és a TRPA1 ioncsatornák aktivációjának következménye, kontroll kísérleteket végeztünk, melyek során a receptort nem expresszálo sejteken hajtottuk végre a megfelelő kezeléseket.

A mérések során használt, TRPA1 receptorokat stabilan expresszálo CHO sejt vonalakat a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézetben Dr. Sándor Zoltán állította elő, egy korábbi közleményében ismertetett protokoll szerint<sup>99</sup>.

A TRPA1-gyel stabilan transzfektált CHO sejteket hőkezelt fetális borjú szérummal (10%), L-glutaminnal, nem esszenciális aminosavoldattal, penicillinnel és sztreptomocinnal kiegészített Dulbecco's-Modified Eagle Mediumban (DMEM) tartottuk fent, 37 °C-on. Kezelés előtt eltávolítottuk a médiumot, majd tripszin (0,1% PBS-ben) oldattal 5 percig emésztettük a sejteket. Mintánként 10<sup>4</sup> db TRPA1-et expresszálo CHO sejtet reszuszpendáltunk 100 µL módosított médiumban, majd fluoreszcens kalcium érzékeny Fluo-4 AM festékkel (Invitrogen, 0,4 µL, 1 µg/µL DMSO-ban) inkubáltuk őket 30 percig, 37 °C-on. 400 µl ECS oldat hozzáadása után az így kapott 500 µl szuszpenziót 500 µl, ECS-ben hígított tisztított SSNO<sup>-</sup> illetve kontroll oldattal kezeltük, és áramlási citometriás analízisnek vetettük alá a mintákat. A Fluo-4 AM festéket lézer besugárzással gerjesztettük 488 nm-en, az emittált fluoreszcens jelet pedig 504 nm-en detektáltuk. A kapott fluoreszcencia értékeket a festett kontroll sejtekre kapott háttérfluoreszcencia értékekkel korrigáltuk, míg referenciaként a szelektív TRPA1 agonista mustárolajjal (100 µM ECS-ben hígítva) kezelt sejtekre kapott értéket tekintettük, és az ehhez viszonyított relatív aktiváció értékeket ábrázoltuk az inkubálási idő, illetve a koncentráció függvényében.

## 5. Eredmények és értékelésük

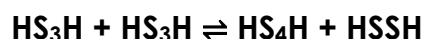
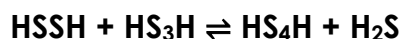
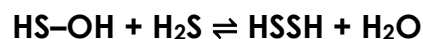
### 5.1. Reaktív kénszármazékok detektálása biológiai rendszerekben

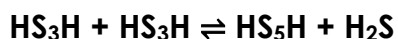
#### 5.1.1. Szervetlen poliszulfidok speciációja

Ahogy a bevezetőben és az irodalmi áttekintésben már említettem, egyre több kísérleti eredmény enged arra következtetni, hogy részben a szervetlen poliszulfidok felelősek számos fiziológias hatás kiváltásáért, melyeket korábban a kénhidrogénhez rendeltek. Biológiai rendszerekben több útvonalon keletkezhetnek, többek között a mitokondriumban lejátszódó oxidatív folyamatok<sup>9</sup>, a szulfid metalloenzimek által katalizált oxidációja<sup>29,100</sup>, vagy éppen a szulfid és nitrogén-monoxid reakciója során<sup>6</sup>. Habár a szulfid reaktív oxigén származékok általi oxidációja sok esetben lassan megy végbe, a neutrofilek által termelt hipoklórossav (HOCl) közel diffúziókontrollált sebességgel oxidálja a szulfidot, szervetlen poliszulfidok képződése mellett, amely folyamat adott körülmények között (pl. gyulladós folyamatok) releváns lehet biológiai rendszerekben<sup>101</sup>. Mechanisztikus megközelítésből a szulfid oxidációja a ciszteinhez hasonlóan szulfénsav (S–OH) köztiterméken keresztül játszódik le<sup>49</sup>:



Habár a szulfénsavak kísérletes karakterizálása nagy reaktivitásuk és rövid élettartamuk következtében még nem teljes, egyes tanulmányokban beszámoltak a szulfid oxidációját követően detektált szulfénsavak illetve egyéb oxidációs termékek jelenlétéről<sup>102</sup>. Az alkilálási reakciókon alapuló detektálási eljárások alkalmazása során tapasztalt problémák és ellentmondások nem csak a per- és poliszulfidált módosulatok detektálását érintik, hanem a szulfénsavak analízisekor is relevánsak, így ezek az eredmények is fenntartással kezelendők. A szulfid oxidációja során keletkező szulfénsav köztitermék várhatóan egy újabb szulfid molekulával gyors reakcióba lépve szervetlen diszulfidot ad, amely ezt követően komproporciós illetve diszproporciós reakciók sorozatában hosszabb láncú poliszulfidok keverékét eredményezi:

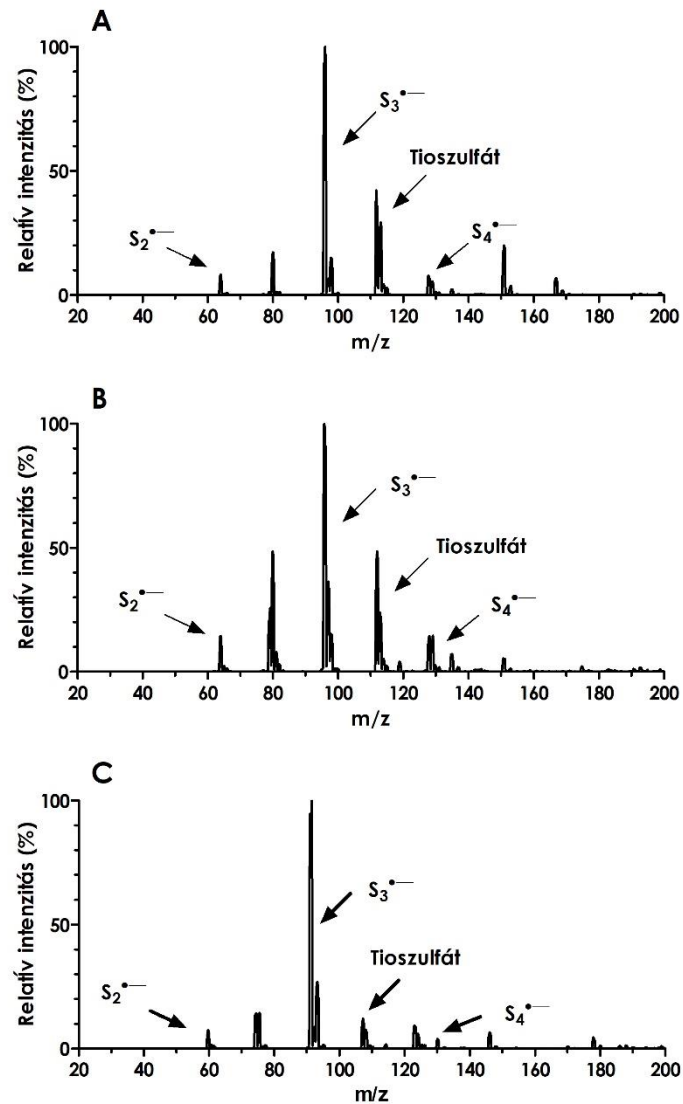




Habár a szerves poliszulfidok létezéséről már az 1700-as években beszámoltak<sup>103</sup>, Berzelius pedig 1822-ben előállította az első kristályos poliszulfid sót<sup>104</sup>, oldatkémiai viselkedésük egyáltalán nem tisztázott. Vitatják a vizes közegben jelenlévő lehetséges leghosszabb poliszulfid lánc hosszát, amelynek meghatározása, valamint a részecskék spektroszkópiai és kromatográfiai módszerekkel történő karakterizálása az előbb említett gyors egymásba alakulás következtében napjainkban is komoly kihívást jelent, emellett elválasztásuk sem megoldott.

Ennek következtében az oldatbeli speciáció tanulmányozására irányuló eljárások mindegyike egy származékképzési reakción alapszik, melynek kulcsfontosságú szerepére a disszertáció későbbi részében fogok kitérni. A jelenleg elterjedt technikák közül a tömegspektrometria lehet alkalmas arra, hogy kromatográfiai elválasztás nélkül is megkülönböztesse a különböző lánchosszúságú poliszulfidokat, így a következőkben a University of Southampton-nal való együttműködésünk keretében, Thomas Sutton közreműködésével vizsgáltuk, hogy az általuk alkalmazott ESI-MS módszer alkalmazható-e a különböző poliszulfid oldatok speciációjának tanulmányozására, az oldatok származékképzési lépés nélküli, ionforrásba történő direkt infúziója által. A szerves poliszulfidok alacsony savi disszociációs állandójából és könnyű ionizálhatóságából kifolyólag a mérés kivitelezése negatív ionizációs módban történt. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a detektált speciáció nátrium-diszulfid, nátrium-triszulfid, és technikai minőségű kálium-poliszulfid oldatokban rendkívül hasonló mintázatot mutat (14. ábra):



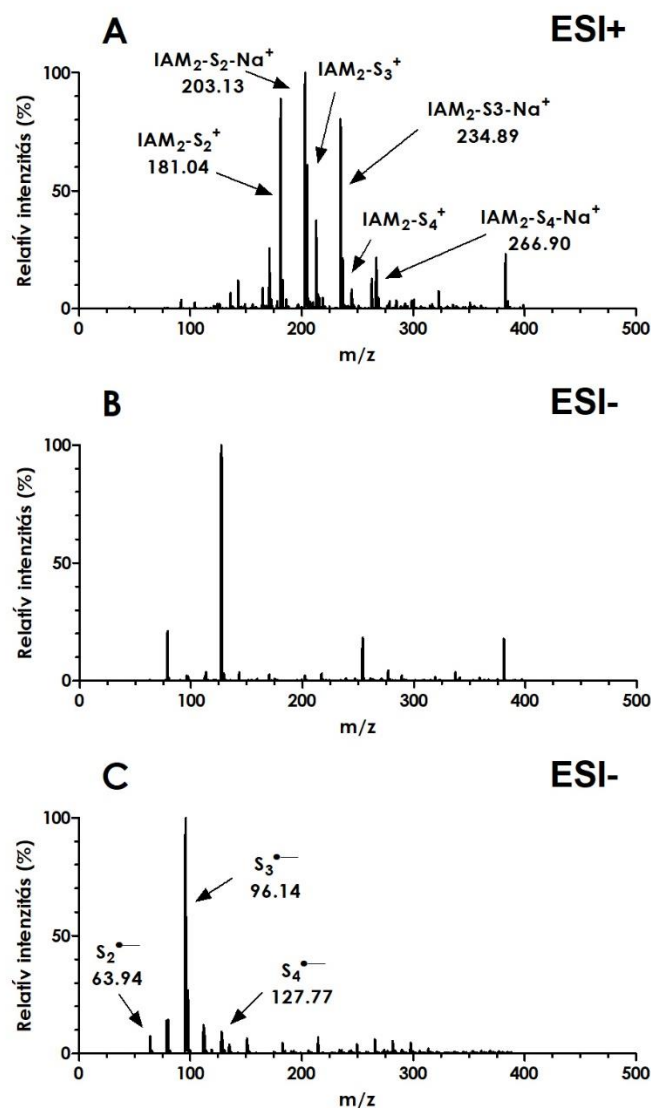


**14. ábra:** K<sub>2</sub>S<sub>x</sub> (A), Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (B) és Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> (C) oldatok speciációjának direkt infúziót követő tömegspektrometriás detektálása<sup>5</sup>  
 (*T*=20 °C, pH 7,40; ammónium–foszfát puffer)

Ahogy a 14. ábra is szemlélteti, az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között a detektált *m/z* értékek alapján a spektrum nem lezárt héjú részecskék hanem gyökanionok jelenlétét reprezentálja, melyet később nagy felbontású MS technikával, az izotóparány vizsgálatával is megerősítettünk. A poliszulfid oldatok kiindulási formájától függetlenül a triszulfid gyökanion (S<sub>3</sub><sup>•-</sup>) a meghatározó részecske, emellett pedig a diszulfid (S<sub>2</sub><sup>•-</sup>) és tetraszulfid gyökanionok (S<sub>4</sub><sup>•-</sup>) is számottevő mennyiségben vannak jelen az oldatokban. Emellett a tiosulfát gyökanionos (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>•-</sup>), és protonált formájának, valamint HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> jelenlétét is sikerült igazolnunk. A gyökök jelenlétét nem csak a poliszulfidok homolitikus bomlása, hanem az ionforrásban

történő artifakt oxidáció is eredményezheti, így javaslatunk szerint ez a módszer az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között nem optimális a speciáció vizsgálatára.

Labilis karakterükből kifolyólag, a szervesetlen poliszulfidok detektálása során az elválasztást egy származékképzési lépés előzi meg. Több tanulmányban is felhívták a figyelmet arra, hogy ez a lépés kritikus és a releváns eredmények érdekében fontos, hogy gyorsabban végbemenjen, mint a poliszulfidok egymásba alakulása<sup>105</sup>. Ezt azonban számos mellékreakció befolyásolhatja, így a részecskék viselkedésének kinetikai és mechanisztikus tanulmányozása komoly kihívást jelent és a mai napig sem megoldott. Erre irányuló munkám első lépésében direkt, elválasztás nélküli tömegspektrometriás analízis során vizsgáltam, hogy az alkilálási reakciók hogyan befolyásolják a szervesetlen poliszulfidok speciációját. A származékképzést nagy koncentrációjú (100 mM) jóacetamid (IAM) alkalmazásával tettük meg, majd pozitív módban detektáltuk a különböző poliszulfid–IAM adduktokat, a negatív töltésű ionok detektálása során pedig meggyőződünk arról, hogy nem maradt elreagálatlan poliszulfid felesleg a reakcióelegyben, azaz az alkalmazott IAM koncentráció és inkubálási idő mellett az alkilálási reakció teljesen végbement. A származékképzést követően legnagyobb mennyiségben a diszulfid adduktot (IAM<sub>2</sub>–S<sub>2</sub>) sikerült detektálnunk, illetve a tri-, és tetraszulfid adduktra jellemző m/z értékek is megjelentek a tömegspektrumban, IAM hozzáadása előtt a spektrális mintázat pedig megegyezett az előző kísérletben kapottal (15. ábra):



**15. ábra:** 100 mM IAM hatása a szervesetlen poliszulfidok speciációjára, 10 perc inkubálást követően<sup>5</sup>

**A:** IAM–poliszulfid adduktok detektálása pozitív módban

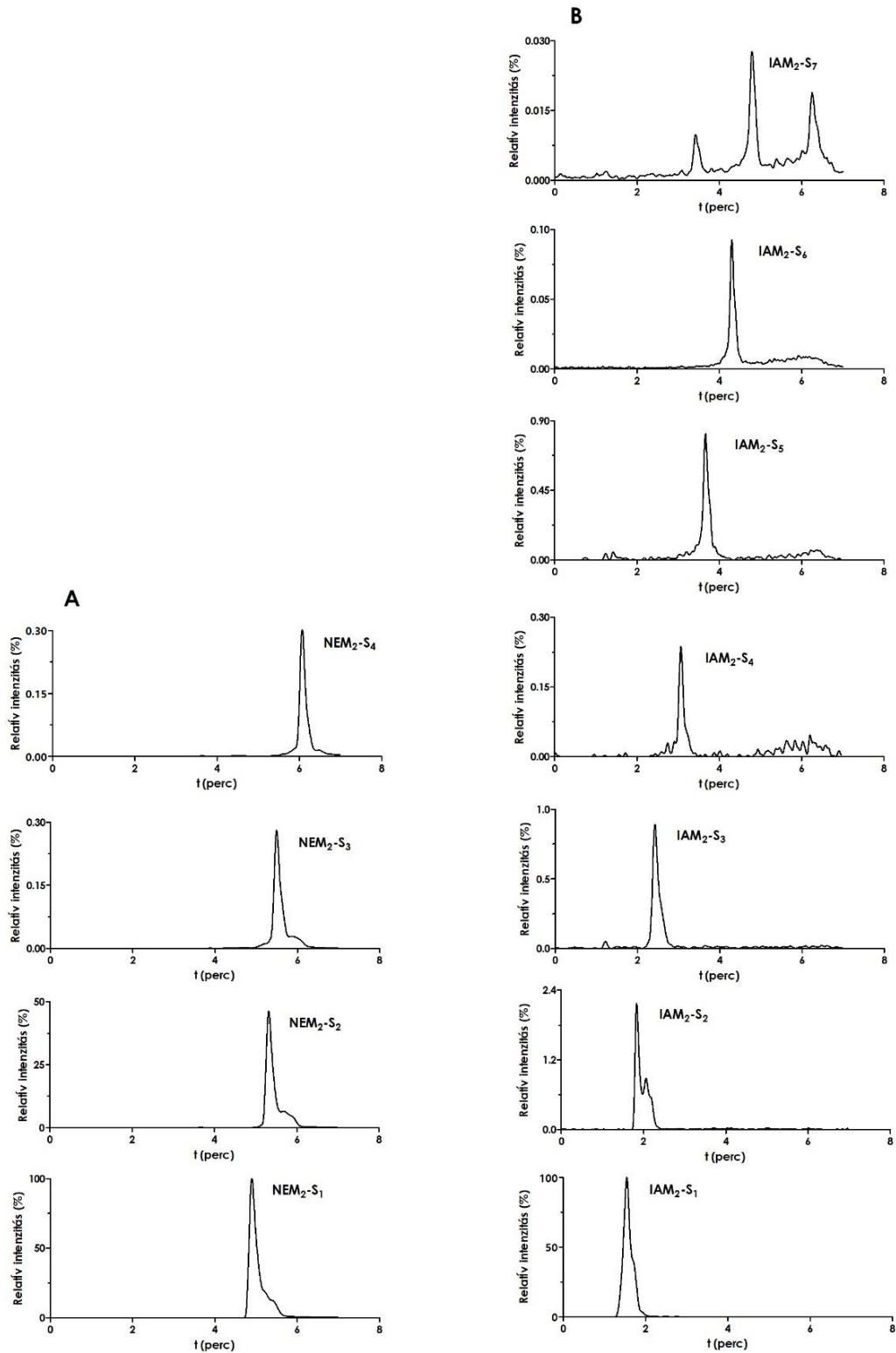
**B:** Poliszulfidok detektálása negatív módban: a spektrumban csak a háttérionokat detektáltuk, amely igazolta, hogy a IAM általi alkilálás 100%-ban végbement

**C:** Poliszulfidok detektálása negatív módban IAM hozzáadása előtt

( $T=20^\circ\text{C}$ , pH 7,40; ammónium–foszfát puffer)

A következőkben két különböző alkilálószer, a jódacetamid (IAM) és az N–etil–maleimid (NEM) speciációra gyakorolt hatását vizsgáltuk több koncentráció mellett, UHPLC–s elválasztást követő MS/MS detektálás segítségével. Az általunk alkalmazott körülmények

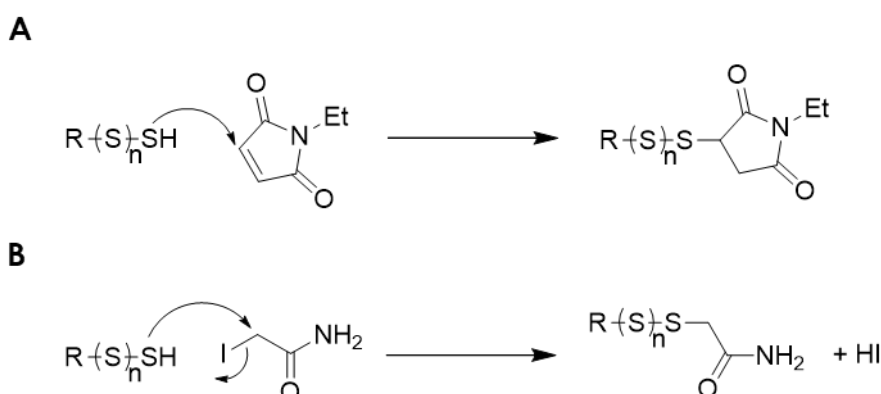
között NEM esetében az S1–S4 adduktokat sikerült detektálnunk, míg IAM esetében hosszabb láncú módosulatok is megjelentek a kromatogramokon (16. ábra). A kísérletet ebben az esetben is többféle poliszulfid sóval elvégeztük. A direkt infúziós kísérletekhez hasonlóan, a spektrális mintázat az összes forma esetén rendkívül hasonló volt, azonban az egyes alkilálószer koncentrációja befolyásolta a részecskék eloszlását.



16. ábra: NEM (A) és IAM (B) szervetlen poliszulfidok speciációra gyakorolt hatásának összehasonlítása<sup>5</sup>

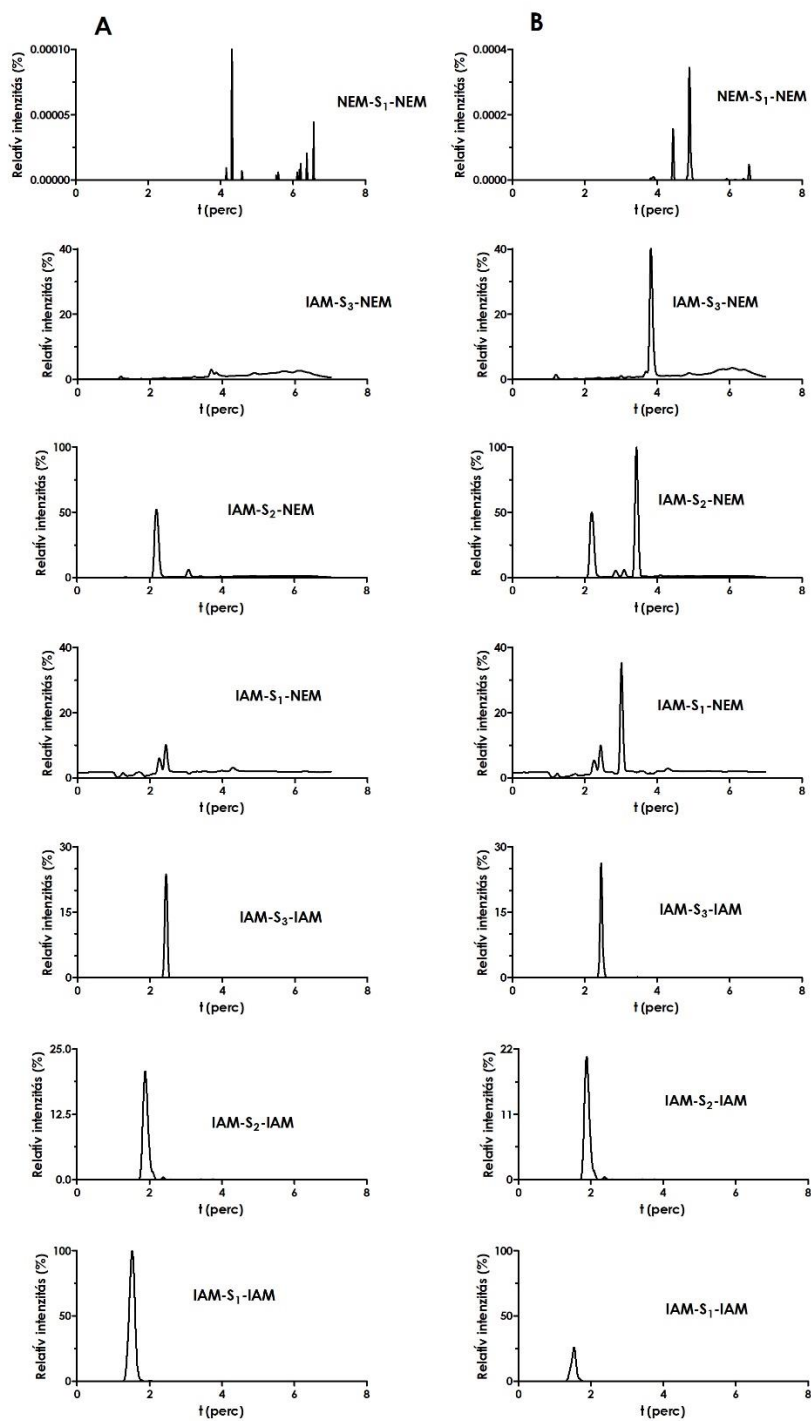
( $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 7,40; ammónium–foszfát puffer)

NEM alkalmazása mellett, a detektált poliszulfidok láncossza az alkilálószer koncentrációjának növelésével csökkenő tendenciát mutatott, míg IAM esetében az összes alkalmazott koncentráció mellett állandónak mutatkozott. A két alkilálószer eltérő hatását magyarázhatja az alkilálás eltérő sebessége, valamint az alkilálás eltérő mechanizmusa: a NEM aktivált kettős kötéssel rendelkező erős elektrofil, amely tiollokkal és poliszulfidokkal Michael-addíciós reakcióba lép. Ezzel szemben IAM esetében egy  $S_N2$  mechanizmusú reakcióban a jól távozó jodidiont helyettesíti a poliszulfid lánc szulfán kénatomja (17. ábra):



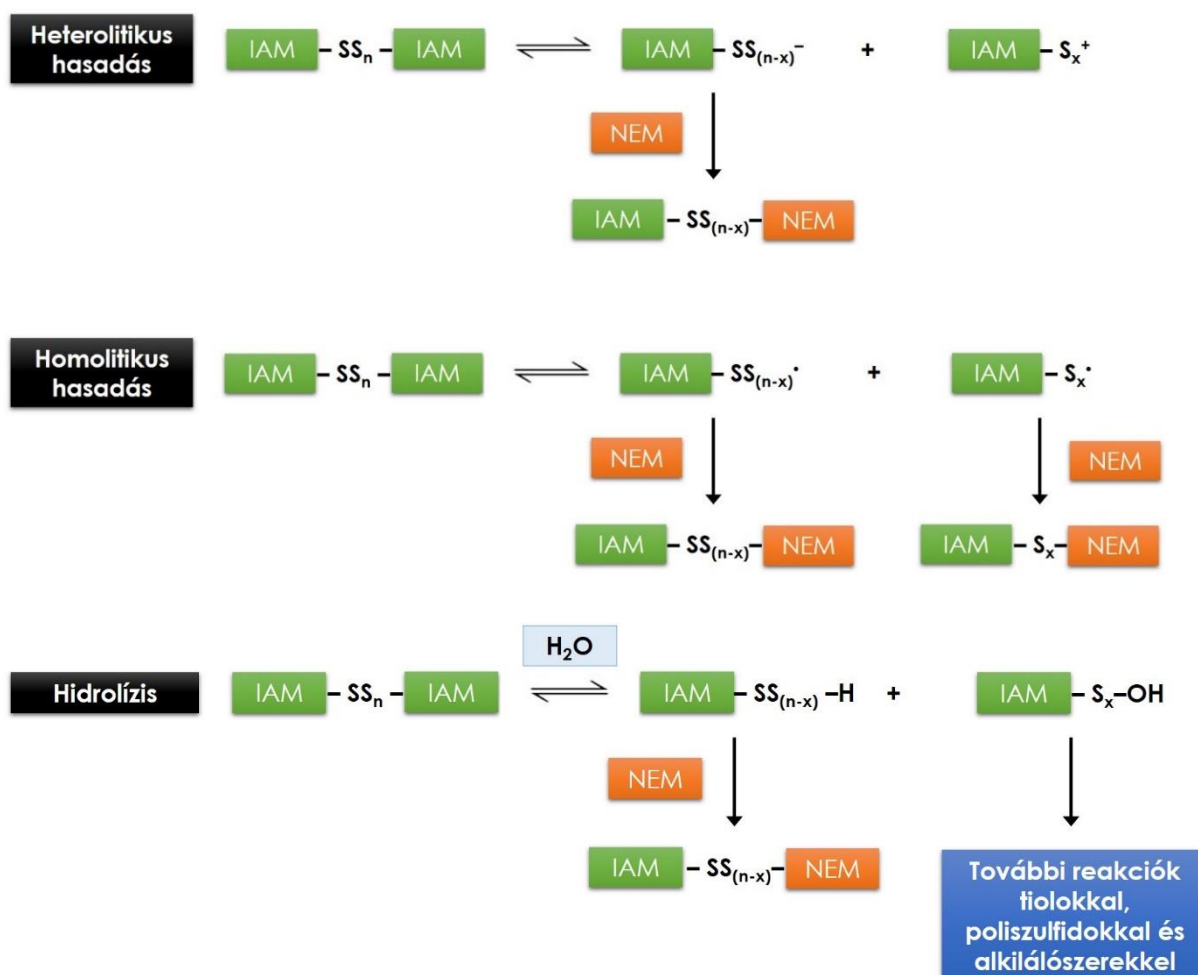
**17. ábra:** A NEM (**A**) és IAM (**B**) általi alkilálási reakciók mechanizmusai<sup>5</sup>

Több nemrégiben megjelent közlemény alapján a IAM-mal ellentétben a NEM képes elhasítani a dialkil-poliszulfid láncokat, ezáltal ezzel az ágenssel nem lehetséges a hosszabb láncú poliszulfidok detektálása<sup>56,106</sup>. Erről a következőkben kísérletesen is meggyőződünk: első lépésben tízszeres IAM felesleg alkalmazása mellett alkiláltuk a poliszulfidokat, majd ezt követően NEM-mel reagáltattuk a már „előalkilált” elegyet.



**18. ábra:** NEM hatása jódcetamiddal előzetesen alkilált poliszulfidok eloszlására  
**A:** Alkilált poliszulfid adduktok eloszlása jódcetamiddal való inkubálást követően,  
NEM hozzáadása előtt  
**B:** Alkilált poliszulfid adduktok eloszlása jódcetamiddal, majd NEM-mel való  
inkubálást követően<sup>5</sup>  
( $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 7,40; ammónium-foszfát puffer)

Ahogy a 18. ábra szemlélteti, NEM hozzáadása után is sikerült detektálnunk az S1–S3 poliszulfid–IAM adduktokat, azonban már sokkal kisebb mennyiségben, mint az előalkilálást követően. A hosszabb láncú származékok viszont eltűntek a kromatogramokról, ellenben S1–S3 esetében úgynevezett hibrid adduktok jelentek meg, amelyek egyik végükön a IAM-ból származó karboxamidometil, másik végükön pedig a NEM-ből származó szukcinimid molekularészt tartalmazták. Ez arra enged következtetni, hogy a NEM a poliszulfid lánc közepén lévő kénatomokkal is reagálhat, a hosszabb láncok hasítását eredményezve. Ennek mechanizmusa még nem tisztázott, azonban tapasztalataink és kémiai ismereteink alapján több javaslatot is tettünk rá, melyeket a 19. ábra foglal össze:



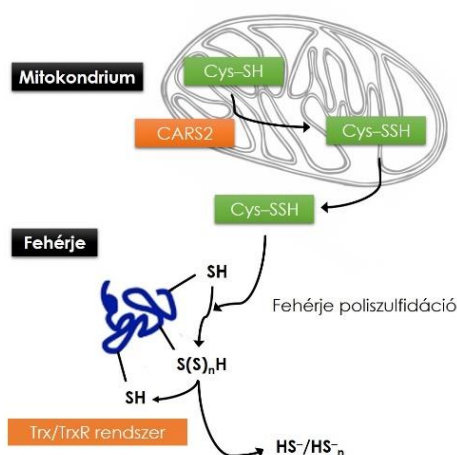
**19. ábra:** A dialkil poliszulfid láncok NEM általi hasításának lehetséges mechanizmusai  
(Az ábrát Bogdándi et al Br Journal of Pharm (2018)<sup>5</sup> alapján készítettem)



A IAM-mal mindkét végükön alkilált poliszulfidok heterolitikus hasadása során egy pozitív és egy negatív töltésű karboxamidoszulfid származék keletkezhet, melyek közül utóbbi nukleofil karakteréből adódóan az elektrofil NEM-mel reagálva a vegyes addukt képződését eredményezheti. A dialkil–poliszulfidok homolitikus hasadása sem kizárt, ennek során gyökök keletkeznek, melyek NEM kettős kötésére való addíciója szintén hibrid adduktokat szolgáltat. A NEM-mel történő alkilálás emellett eltolhatja a poliszulfidok hidrolitikus egyensúlyi reakcióit a hidrolitikus termék képződésének irányába, amely a rövidebb láncú alkilált származékok mellett egy szulfénsav származék megjelenését eredményezi. Utóbbi modell fontos következménye, hogy a szulfénsavak detektálására használt alkilálási eljárások szintén eltolhatják a hidrolitikus egyensúlyt, amely következtében az eredetileg poliszulfid formában jelenlévő módosulatokat is cisztein–szulfénsavként detektáljuk. Biológiai kontextusban ez a megközelítés megkérdőjelezi a szulfénsavak detektálására alkalmazott eljárásokat, amelyre a későbbiekben kísérletesen is rávilágítottunk.

### **5.1.2. Poliszulfidált cisztein oldalláncok speciációja**

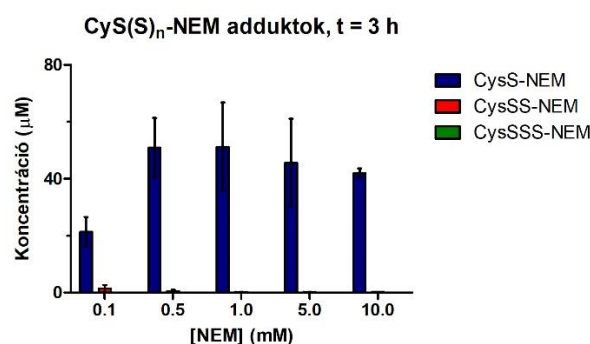
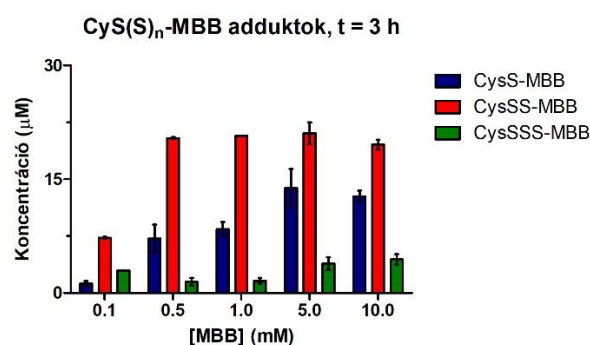
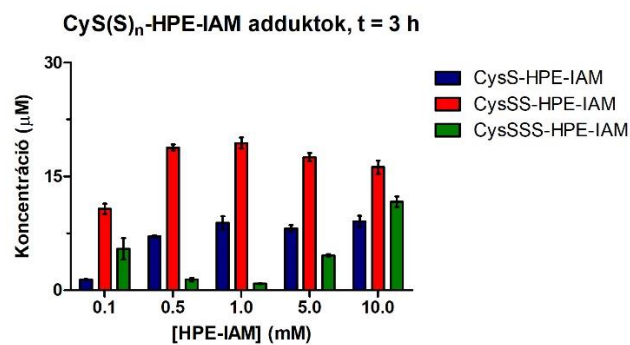
A szerves poliszulfidok eloszlásának tanulmányozását követően a kis molekulatömegű tiolok poliszulfidációjára fókuszáltunk, ugyanis számos közlemény rávilágított, hogy cisztein (CySH) és glutation (GSH) esetében ezek a származékok viszonylag nagy mennyiségben detektálhatók sejtekben és szövetekben. Ahogy azt a bevezetőben ismertettem, poliszulfidált cisztein származékok keletkezhetnek a cisztein vagy szulfid oxidatív poszttranszlációs folyamatai során, emellett a cisztin CBS és CSE katalizált enzimátikus átalakításai illetve a cisztein piridoxál–függő *ciszteinil-tRNS szintetáz* enzim (CARS2) általi átalakítása oxidáló ágens és szulfid jelenléte nélkül is poliszulfidált származékok képződéséhez vezet. Ezen módosulatok több tanulmány szerint is transzperszulfidációs reakciók által vezérlik egyes funkcionális és szabályozó fehérjék működését, ezáltal kulcsfontosságú szerepük van a poliszulfidok által vezérelt redox jelátviteli folyamatokban (20. ábra).



**20. ábra:** A CARS2 enzim általi perszulfidképződés és az azt követő transzperszulfidációs reakciók sematikus ábrázolása  
(Az ábrát Akaike et al Nat Comm (2017)<sup>56</sup> alapján készítettem)

Mivel detektálásuk szintén egy kezdeti származékképzésen alapszik, a következőkben szisztematikusan megvizsgáltuk, hogy vizes oldatban az alkilálás hogyan befolyásolja speciációjukat.

A poliszulfidált CySH illetve GSH módosulatok előállítása az adott tiol vagy diszulfid forma szervesen poliszulfidokkal vagy szulfiddal történő reakciójával történt. Mennyiségi analízisüket több izotóppal jelölt belső standard hiányában a per- és triszulfid részecskékre korlátoztuk. Egy újabban kifejlesztett, tömegspektrometrián alapuló eljárás segítségével többféle inkubálási idő és koncentráció speciációra gyakorolt hatását megvizsgáltuk három alkilálószer: a jódacetamid hidroxifenil analógja (HPE-IAM), a klinikai minták analízise során széles körben használt monobromobimán (MBB) és a már említett N-étilmaleimid (NEM) alkalmazása mellett. Ahogy a 21. ábrán látható, 3 óra inkubálást követően a HPE-IAM koncentrációja a 0,5–10 mM tartományban csak elenyésző mértékben befolyásolta a cisztein- és glutation-perszulfid adduktok mennyiségét. A detektált triszulfid-adduktok mennyisége azonban az alkilálószer koncentrációjának növelésével nőtt, ami arra enged következtetni, hogy kisebb koncentrációk esetén az alkilálás befolyásolja a reaktív kénszármazékok egyensúlyi reakciót, valamint a hosszabb láncú módosulatok származékképzése lassabban játszódik le. A speciáció 6 órás inkubálás során sem változott számottevő mértékben, ami arra utal, hogy a HPE-IAM nem hasítja effektíven a már alkilált poliszulfid láncokat.



**21. ábra:** HPE-IAM, MBB és NEM hatása poliszulfidált cisztein módosulatok speciációjára<sup>5</sup>

100 μM CySH, 300 μM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, 0,1–10 mM HPE-IAM/MBB/NEM

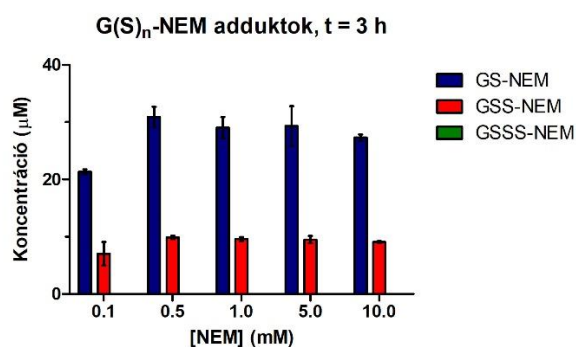
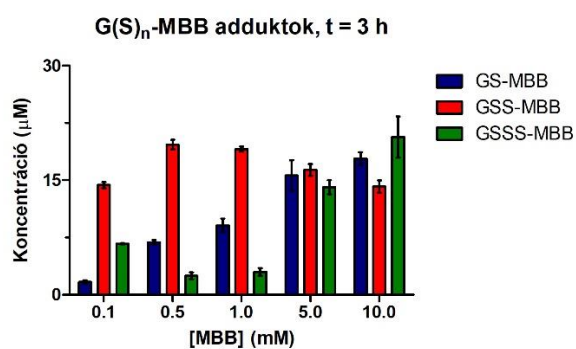
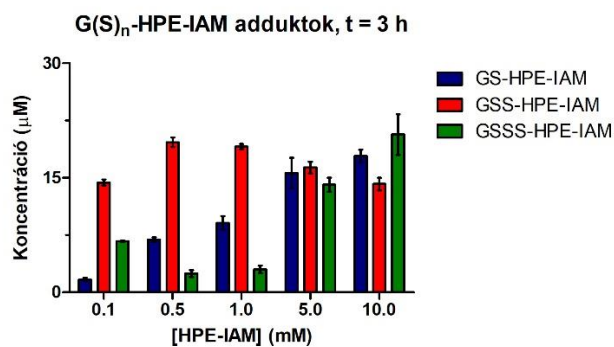
*pH = 7,50; szobahőmérséklet*

(A mérési pontok és a hozzájuk tartozó hibásávok n = 3 független kísérleti eredmény átlagát és szórását (SD) reprezentálják)

NEM-mel elvégezve a kísérleteket, a szeretlen poliszulfidokhoz hasonlóan ebben az esetben is teljesen eltérő eloszlási mintázatot detektáltunk. A legszembevetőbb a perszulfid-adduktok csökkent mennyisége volt mind CySH, mind GSH esetén, amely a cisztein tekintetében mind az inkubálási idő, mind az alkilálószer koncentrációjának növelésével tovább

csökkent. Triszulfid adduktokat nem találtunk detektálható mennyiségben, amely a többi megfigyeléssel együtt megerősíti, hogy a NEM alkalmazása mellett inkább az alkilált tiolok képződése preferált. Meglepő módon a ciszteinnel ellentétben az inkubálási idő illetve a NEM koncentrációja a glutation–perszulfid módosulatok mennyiségét nem befolyásolta kiugró mértékben, illetve ezen részecskéket sokkal nagyobb mennyiségben sikerült detektálnunk, a megfelelő cisztein–poliszulfid–NEM adduktokhoz képest, melynek alapján a származékképzési reakciók sebessége és speciációra gyakorolt hatása a kísérleti körülmények mellett a detektálni kívánt módosulatok minőségétől is függ.

Monobromobimánt (MBB) alkalmazva alkilálószerként, a koncentráció a HPE–IAM–hoz hasonlóan kevésbé befolyásolta a perszulfid módosulatok koncentrációját, ellenben az MBB koncentrációjának növelése a triszulfid adduktok mennyiségének növekedéséhez vezetett, megerősítve az általunk feltételezett Curtin–Hammett kontroll érvényességét. Magasabb MBB koncentrációk esetén azonban az inkubálási idő növelésével csökkent a triszulfid adduktok mennyisége, amely arra enged következtetni, hogy a NEM-hez hasonlóan az MBB is elhasítja a hosszabb láncú módosulatoakat. Az egyes alkilálószer specióóra gyakorolt hatását, illetve az azok közötti különbségeket a 22. ábra szemlélteti:



**22. ábra:** HPE-IAM, MBB és NEM hatása poliszulfidált glutation módosulatok speciációjára<sup>5</sup>

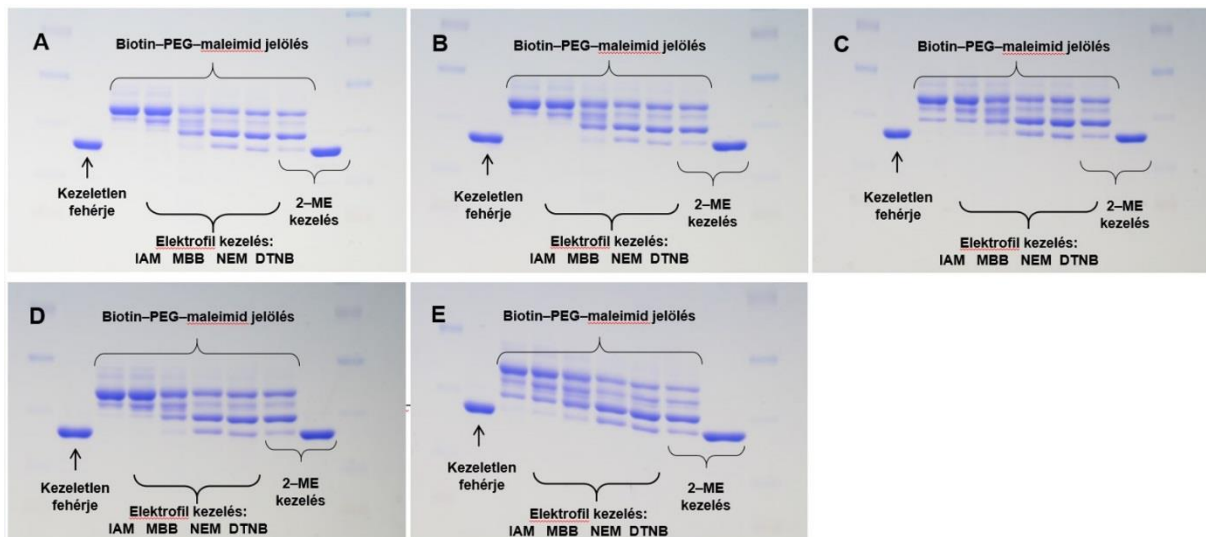
100 μM GSH, 300 μM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, 0,1–10 mM HPE-IAM/MBB/NEM

*pH = 7,50; szobahőmérséklet*

(A mérési pontok és a hozzájuk tartozó hibásávok n = 3 független kísérleti eredmény átlagát és szórását (SD) reprezentálják)

### 5.1.3. Poliszulfidált GAPDH oldalláncok alkilálása

A következőkben a poliszulfid láncok alkilálószerrel általi lánchasítását tanulmányoztuk a szerves poliszulfidok és a kis molekulatömegű tiolok után egy újabb modellen, a *gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz* fehérjén (GAPDH) egy újonnan kifejlesztett detektálási eljárás (PMSA) segítségével, melynek alapja éppen a poliszulfidált oldalláncok NEM általi hasítása. Első lépésben a GAPDH-t különböző koncentrációjú  $\text{Na}_2\text{S}_2$  illetve  $\text{Na}_2\text{S}_3$  oldatokkal kezeltük, amely hasonló mintázatot adott, köztük a negatív kontroll (poliszulfiddal nem kezelt) mintában is arra utalva, hogy a fehérje cisztein oldalláncai már alapállapotban poliszulfidáltak, amely összhangban áll Akaike és munkatársai megfigyeléseivel<sup>56</sup>. Ahogy a 23. ábra is szemlélteti, az alkalmazott alkilálószer minősége azonban nagyban befolyásolta a kapott mintázatot: a NEM hasította legintenzívebben a már alkilált poliszulfid láncokat, az MBB szintén elhasította a poliszulfidokat, míg a IAM alkalmazása nem vezetett számottevő lánchasításhoz. További tapasztalat, hogy a NEM általi hasítás mértéke megegyezett a DTNB vagy a 2-merkaptoetanol hatásával, ami arra enged következtetni, hogy ez az ágens elhasította az összes poliszulfidált cisztein oldalláncot.



**23. ábra:** Poliszulfidált cisztein oldalláncok detektálása GAPDH modellfehérjén, PMSA eljárás segítségével<sup>5</sup>

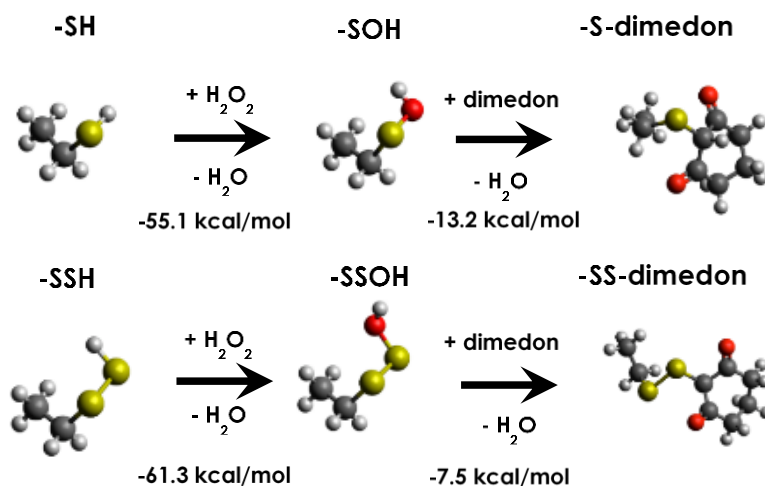
**A:** kezeletlen fehérje **B:** 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2$ -dal kezelt fehérje **C:** 1 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2$ -dal kezelt fehérje, **D:** 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{S}_3$ -dal kezelt fehérje, **E:** 1 mM  $\text{Na}_2\text{S}_3$ -dal kezelt fehérje

## 5.2. Cisztein–poliszulfénsavak dimedonos detektálása

A poliszulfid láncok alkilálás indukálta hasítás mechanizmusára javasolt modelleket (heterolitikus hasítás, homolitikus hasítás, hidrolízis) az 5.1.1. fejezetben ismertettem. Ezek közül a következőkben a hidrolízist szeretném részletesen taglalni, ugyanis ha ez a reakció valóban lejátszódik, az rendkívül komoly és megfontolandó kérdéseket vet fel a fehérje szulfénsavak detektálását illetően. A szulfénsavak jelentőségét újabban széles körben tanulmányozzák, ugyanis több kutatási eredmény alapján is javasolták, hogy szabályozó funkcióval rendelkeznek a redox jelátvitel során. Ezen reaktív, átmeneti részecskék 1,3–diketon származékokkal való detektálása napjainkban széles körben alkalmazott, rutinszerű eljárás, lehetővé téve fehérjékből való kimutatásukat is<sup>48,107</sup>. A fehérje perszulfidok abundáns mennyisége, megnövekedett nukleofilicitása és redukciós kapacitása valamint a már említett hidrolitikus egyensúlyi reakciók megzavarása azonban a cisztein–szulfénsavak megváltozott mennyiségét eredményezheti. Ennek legfőbb következménye az lehet, hogy a biológiai rendszerekben szulfénsavként detektált módosulatok egy része valójában per- és poliszulfid módosulatokat reprezentál, amely komoly megfontolást igényel az eredmények értelmezése során.

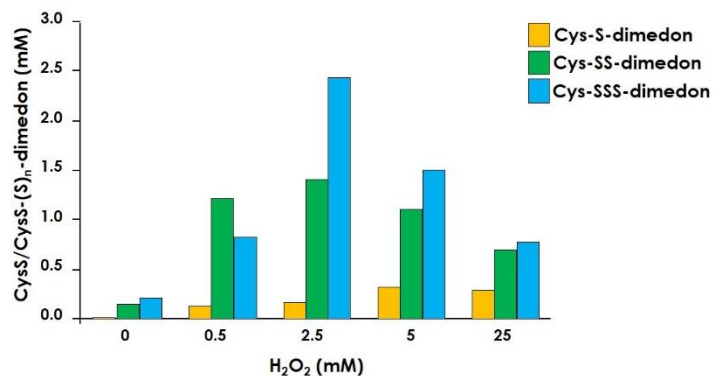
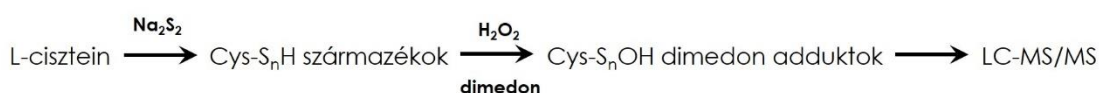
### 5.2.1. Oxidáció által keletkező poliszulfénsavak dimedonnal történő detektálása

A cisztein–szulfénsavak keletkezésére általánosan elfogadott útvonal a ciszteinek reverzibilis oxidációja. Korábbi eredményeink arra utaltak, hogy a tiolok jelentős része perszulfid formában detektálható<sup>56</sup>, melyek megnövekedett oxidációs hajlama<sup>37</sup> arra enged következtetni, hogy ezek a módosulatok a reaktív oxigén származékok preferált célpontjai lehetnek. Oxidációjuk úgynevezett pertioszulfénsav köztitermékek keletkezését eredményezi, amelyek ugyanúgy célpontjai lehetnek a szulfénsavak detektálása során alkalmazott 1,3–diketonoknak. Ezt a feltételezést nemzetközi munkatársainkkal való együttműködésünk során sikerült igazolnunk, mind elméleti kémiai számolások, mind kísérletes eredmények segítségével. Sűrűségfunkcionál számítások arra utaltak, hogy a perszulfidok dimedonnal való direkt reakciója energetikailag gátolt, azonban készségesen oxidálódnak a megfelelő pertioszulfénsav köztiterméké, a dimedon pedig a szulfénsavak mellett ezen részecskékkel is szelektíven reagál (24. ábra).



**24. ábra:** A cisztein–szulfénsavak és cisztein–pertioszulfénsav közttermékek oxidáció általi keletkezésére, valamint dimedonos detektálására ab initio számítások alapján javasolt modell<sup>102</sup>

Hasonló eredményre jutottunk a poliszulfidált ciszteinek peroxiddal való oxidációját követő dimedonos detektálás tanulmányozásakor (25. ábra), valamint többféle sejtes rendszerben is sikerült igazolni, hogy több redox érzékeny tirozin–kináz fehérjében (EGFR, Src) a ciszteinek jelentős hányada poliszulfidált formában van jelen, melyek oxidációra való megnövekedett hajlamuk következtében készséggel reagálnak a reaktív oxigén származékokkal. Oxidációjuk pertioszulfénsavak keletkezéséhez vezet, amelyek a tiolfehérjéket érintő redox jelátvitel új, eddig azonosítatlan közttermékei.

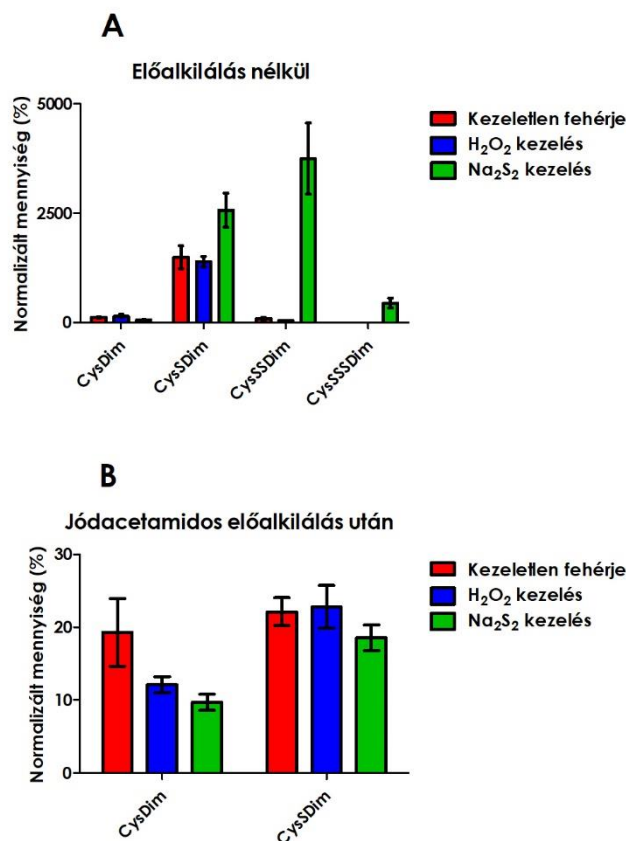


**25. ábra:** Cisztein–poliszulfénsavak keletkezése és dimedonos detektálása (Az ábrát Heppner DE et al Red Biol (2018)<sup>102</sup> alapján készítettem)



### **5.2.2. Hidrolízis által keletkező cisztein–poliszulfénsavak dimedonnal történő detektálása**

Az alkilálás indukálta poliszulfid hasításra javasolt mechanizmusok ismertetésekor (5.1.1. fejezet) már említettem, hogy ha a poliszulfidált ciszteinek 19. ábrán javasolt hidrolitikus reakciója valóban lejátszódik, akkor a szulfénsavak dimedonos detektálása az irreverzibilis származékképzés révén a termékképződés felé fogja eltolni az egyensúlyt. Továbbá, a már alkilált poliszulfidok heterolitikus hasadása során keletkező pozitív töltésű részecske gyors hidrolízise szintén a megfelelő szulfénsav köztitermék képződéséhez vezet és hasonlóan eltolható a termékképződés felé. Ennek következtében a szulfénsavként detektált módosulatok egy része feltehetőleg az eredetileg poliszulfidált állapotban lévő részecskéket reprezentálja. Erről a feltételezésünkről kísérletesen is meggyőződünk, GAPDH modellfehérje alkalmazásával. A fehérjét előredukció után peroxidos illetve szervesetlen poliszulfidos kezelésnek vetettük alá, melyet követően dimedonnal detektáltuk a cisztein–szulfénsav módosulatokat. A kísérlet eredményét a 26. ábra szemlélteti. Meglepő módon a poliszulfiddal kezelt mintákban detektáltuk a legtöbb dimedonnal jelölt származékot annak ellenére, hogy ez a kezelés nem vezet direkt szulfénsav képződéshez. Habár a peroxiddal kezelt mintákban (melyről tudjuk, hogy a cisztein tiolok direkt oxidációját előidézve szulfénsavakat generál) várakozásainknak megfelelően több cisztein–dimedon adduktot detektáltunk, mint a kezeletlen, vagy poliszulfiddal kezelt mintákban, a poliszulfid–dimedon adduktok tekintetében a poliszulfiddal kezelt GAPDH mintákban találtuk a legtöbb módosulatot. Az eredmények alapján nehéz eldönteni, hogy a detektált részecskék a poliszulfidok hidrolízise, vagy a GAPDH autooxidációja során keletkeztek. A mintákat a kezelés előtt 100 mM IAM-mal előalkilálva viszont több nagyságrenddel csökkent a dimedonnal jelölt származékok mennyisége, amely arra enged következtetni, hogy dialkil–poliszulfidok hidrolízise csekélyebb valószínűséggel dominál az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között. Ennek tisztázása végett a dimedonos jelölés részletesebb kinetikai illetve mechanisztikus vizsgálata indokolt, azonban az elméleti számítások, valamint a több modellen is elvégzett kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a korábban szulfénsavként azonosított származékok egy része a kémiai egyensúlyok eltolása következtében valójában poliszulfidált módosulatokat reprezentál.



**26. ábra:** Cisztein–dimedon illetve cisztein–poliszulfid–dimedon adduktok detektálása kezeletlen/peroxiddal/poliszulfiddal kezelt GAPDH mintákban<sup>5</sup> (A mennyiségek normalizálása az előalkilálás nélküli mintákban detektált cisztein–dimedon adduktokra történt, a mérési pontok és a hozzájuk tartozó hibasávok n = 5 független kísérleti eredmény átlagát és standard hibáját (SEM) reprezentálják)

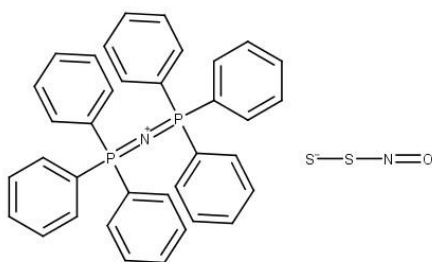
### 5.3. A kénhidrogén és a nitrogén–monoxid által vezérelt jelátviteli útvonalak összefonódása

Ahogy már a bevezetőben említettem, a kénhidrogén által vezérelt jelátviteli folyamatok egyik újonnan vizsgált aspektusa a nitrogén–monoxid által szabályozott jelátviteli reakciókkal való kommunikáció. Napjainkra a két kismolekula kooperatív aktivitása már elfogadott, amely több szinten is megvalósul: egyrészt kölcsönösen szabályozzák a másik bioszintéziséért felelős enzimek expresszióját és aktivitását, míg a köztük vagy metabolitjaik között végbemenő közvetlen reakciók számos fiziológiás hatás kiváltásáért felelős hibrid molekulák képződésével járhatnak. Az erre irányuló tanulmányok jelentős része a közös biológiai hatások vizsgálatára

fókuszál, amelyek leginkább a szív- és érrendszeri működés szabályozásán keresztül nyilvánulnak meg, azonban beszámoltak a redox jelátviteli folyamatokat befolyásoló tényezőkről is<sup>66</sup>. Doktori kutatásom során a nitrozotiolok feleslegben lévő szulfiddal való reakciójának egyik fő közttermékét, a nitrozoperszulfidot ( $\text{SSNO}^-$ ) tanulmányoztam. Kísérleteim során elvégeztem az  $\text{SSNO}^-$  kémiai jellemzését, vizsgáltam a bomlásakor indukált perszulfidációs és poliszulfidációs folyamatokat, valamint potenciális biológiai hatásainak lehetséges mechanizmusaira is javaslatot tettem.

### 5.3.1. Nitrozoperszulfid, a nitrozotiolok és szulfid kölcsönhatásának egyik fő köztterméke – spektrális és kinetikai jellemzés

A szulfid és NO által vezérelt jelátviteli utak közötti kommunikációt illetően doktori kutatásom egyik célja a két jelátviteli részecske és származékaik közötti kémiai kölcsönhatások következtében keletkező egyik fő közttermék, a nitrozoperszulfid ( $\text{SSNO}^-$ ) kémiai és biológiai hatásának tanulmányozása volt. A nitrozoperszulfid előállítása Seel és Wagner nevéhez fűződik, akik az 1980-as években bisz(trifenilfoszfin)iminium ( $\text{PNP}^+$ ) sójaként kristályosították ki az  $\text{SSNO}^-$ -t<sup>88</sup> (27. ábra). A preparatív munka mellett elvégezték a  $\text{PNP}^+\text{SSNO}^-$  spektrális jellemzését különböző szerves oldószerekben, illetve szerkezetét is meghatározták röntgenkristallográfiás analízis segítségével. Továbbá, megfigyeléseik szerint a nitrogén-monoxid feleslegben lévő szulfiddal való reakciója bázikus vizes oldatban,  $\text{SSNO}^-$  képződéséhez vezet, amit később fiziológiás pH-n is azonosítottak nitrozotiolok szulfiddal való reakcióját követően.

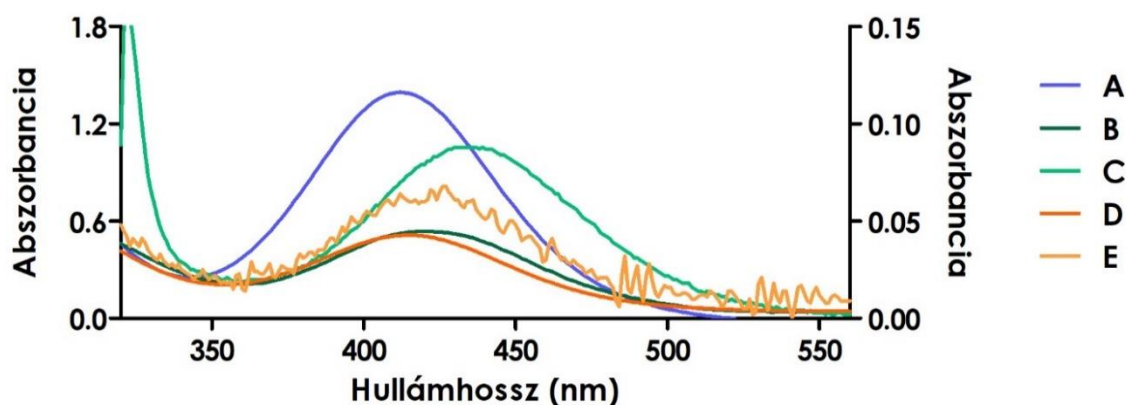


27. ábra: a  $\text{PNP}^+\text{SSNO}^-$  szerkezeti képlete

Seel és Wagner szerint acetóban a  $\text{PNP}^+\text{SSNO}^-$  elnyelési maximuma 448 nm, míg moláris abszorpciós koefficiense  $2800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Kutatócsoportunkkal együttműködve, Cortese–Krott és

munkatársai vizes oldatban, fiziológias körülmények között is elvégezték a nitrozotiolok és szulfid reakciójában keletkező nitrozoperszulfid spektrofotometriás jellemzését, és az általuk közölt abszorpciós maximum és moláris abszorpciós koefficiens 412 nm, illetve  $6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Kémiai karakterizálása során megállapították, hogy az  $\text{SSNO}^-$  számottevő stabilitással rendelkezik fiziológias körülmények között, valamint lassú bomlása nitrogén-monoxid és szerves poliszulfidok felszabadulásához vezet. Ezzel szemben, Wedman és munkatársai szerint az  $\text{SSNO}^-$  fiziológias körülmények között nem stabil, és a 412 nm-en megfigyelt abszorbanciaváltozás a reakcióelegyben szennyezőként jelenlévő poliszulfidokhoz rendelhető. Kísérleteik során Seel és Wagner módszerének megfelelően kristályos formában,  $\text{PNP}^+\text{SSNO}^-$ -ként állították elő az  $\text{SSNO}^-$ -t, és acetontól metanolban is tanulmányozták spektrális jellemzőit, ahol az általuk közölt abszorpciós maximum 422 nm volt.

Ezen kémiai egyet nem értés feloldása végett ezt a kísérletet fordított megközelítésből végeztem el: saját módszerem szerint, a nitrogén-monoxid donor S-nitroso-N-acetil-DL-penicillamin (SNAP) és feleslegben lévő szulfid reakciójával, vizes közegben állítottam elő nitrozoperszulfidot, majd metanollal és acetonnal való tízszeres hígítását követően tanulmányoztam a spektrumokat. Ahogy a 28. ábra is szemlélteti, a hígítást követően a Wedmannék megfigyelésével azonos batokrómm eltolódásokat figyeltem meg mindkét közegben, az abszorbancia maximum értékek közötti korreláció pedig arra enged következtetni, hogy ugyanaz a vegyület van jelen mind a  $\text{PNP}^+\text{SSNO}^-$ , mind a SNAP-szulfid reakcióelegy metanos, illetve acetonos oldatában.

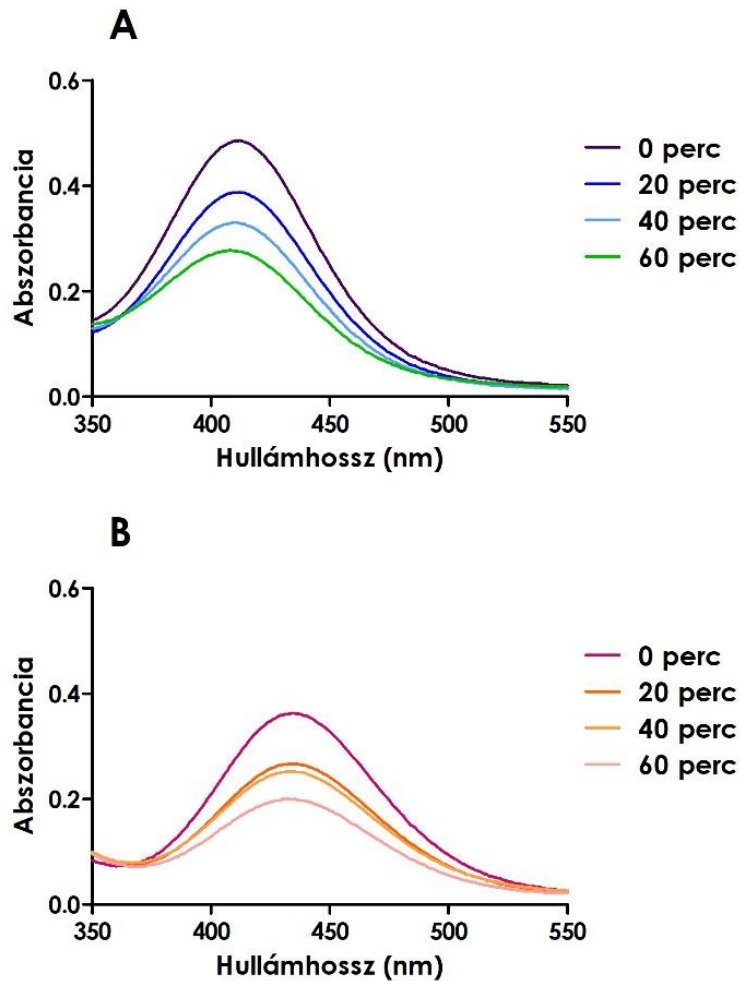


**28. ábra:** UV-Vis spektrális változások az  $\text{SSNO}^-$  vizes közegben történő előállítását (1 mM SNAP: 10 mM  $\text{Na}_2\text{S}$ ), majd metanolba és acetontba történő hígítását követően (az **A**, **B** és **D** spektrumok a bal oldali, míg a **C** és **E** spektrumok a jobb oldali y tengelyhez vannak rendelve)

$\lambda_{\max}$  (200  $\mu\text{M}$  SSNO<sup>-</sup> Tris/HCl pufferben) = 412 nm (**A**),  $\lambda_{\max}$  (50% puffer–50% aceton) = 418 nm (**B**),  $\lambda_{\max}$  (10% puffer–90% aceton) = 439 nm (**C**),  $\lambda_{\max}$  (50% puffer–50% metanol) = 415 nm (**D**),  $\lambda_{\max}$  (10% puffer–90% metanol) = 426 nm (**E**)

A spektrális jellemzés mellett egy kinetikai analízist is elvégeztem annak érdekében, hogy mennyiségi eredményekkel is alátámasszam a két vegyület azonosságát, ezáltal pedig igazoljam, hogy az általam előállított SNAP–szulfid reakcióelegy is a Seel és Wagner, valamint a Wedmann és munkatársai által azonosított nitrozoperszulfidot tartalmazza. A nitrozotiolokkal ellentétben a nitrozoperszulfid fiziológias körülmények között viszonylag stabil, lassú és folyamatos bomlásáról pedig már beszámoltak a szakirodalomban. Következő kísérletemben ezt tanulmányoztam vizes közegben, szerves közegbe történő hígítással kiegészítve.

Kísérletem során a SNAP és szulfid reakciójával előállított elegyet adott időpontokban pufferben illetve acetonban tízszeresére hígítottam, majd felvettem a spektrumokat (29. ábra). A kapott abszorbanciák, valamint az általam korrigált moláris abszorpciós koefficiensek felhasználásával kiszámítottam a pontos koncentrációkat mindkét közegben, melyek konzisztensnek mutatkoztak. Megfigyeléseim egyrészt cáfolták Filipovicék javaslatát, amely szerint a 412 nm-en megfigyelt abszorbanciaváltozás a nitrozotiolok és feleslegben lévő szulfid reakciója következtében melléktermékként képződő szerves poliszulfidok jelenlétéhez rendelhető, hiszen azok bomlása gyorsabban végbemegy. Másrészt, az általuk SSNO<sup>-</sup>-hoz rendelt spektrális változások időben is korreláltak saját kísérletem eredményeivel; bizonyítva, hogy az általam előállított nitrozoperszulfid a Wedmannék által előállított PNP<sup>+</sup>SSNO<sup>-</sup>-val azonos spektrális tulajdonságokkal rendelkezik, valamint az NO–szulfid kölcsönhatás meghatározó köztiterméke.



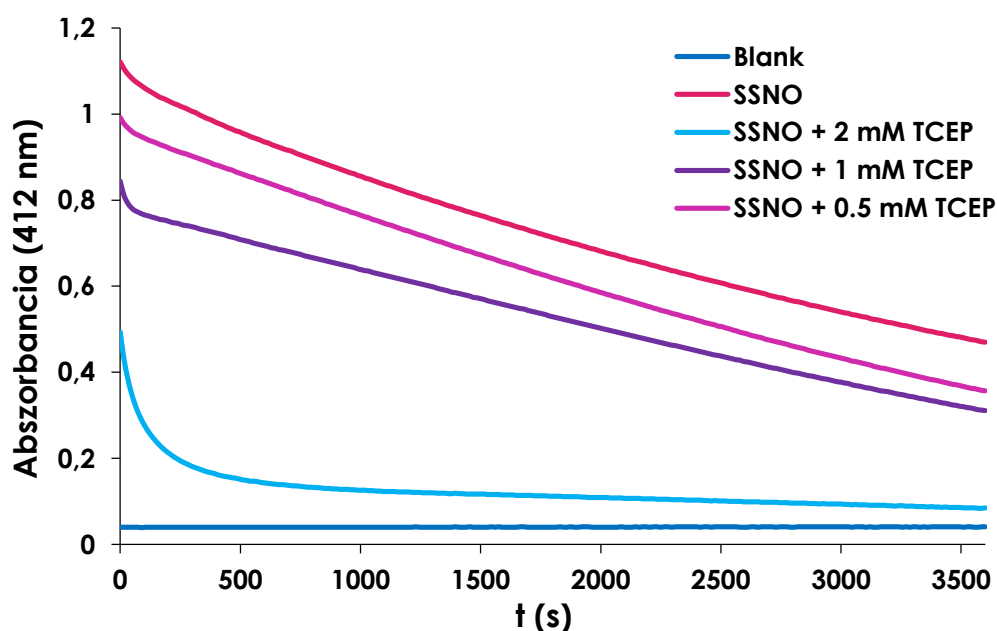
**29. ábra:** UV-Vis spektrális változások az  $\text{SSNO}^-$  bomlásának tanulmányozása során 200 mM Tris/HCl (pH= 7,40) pufferben előállított 1 mM SNAP : 10 mM  $\text{Na}_2\text{S}$  elegy (~300  $\mu\text{M}$   $\text{SSNO}^-$ ) spektrumai pufferben (**A**) és acetonban (**B**) történő tízszeres hígítást követően

### 5.3.2. Nitrozoperszulfid reakciója redukálószerekkel

A biokémiai hatás tanulmányozásához a melléktermékektől (szervetlen polyszulfidok, szulfid) lehető legnagyobb mértékben megtisztított nitrozoperszulfidra van szükség. A polyszulfidok legegyszerűbben redukció által távolíthatók el a rendszerből, amely reakció szulfidot eredményez. Ezt követően, az előállítás során feleslegben maradt és a polyszulfidredukció során keletkező szulfid az oldat nitrogénes vagy argonos kibuborékolásával távolítható el. A polyszulfidok redukciójához választott ágens során körültekintőnek kellett lennünk, ugyanis

esetünkben egy szelektív redukálószerre volt szükség, amely a poliszulfidokat hatékonyan redukálja, azonban a nitrozoperszulfiddal nem reagál.

Sajnos a diszulfidkötések redukációjára széles körben alkalmazott redukálószer, a *tris(2-karboxietil)foszfin* (TCEP) nem bizonyult szelektívnek: nagyobb koncentrációkban a poliszulfidok mellett a nitrozoperszulfid mennyisége is nagyban csökkent a redukció során (30. ábra). Habár kisebb koncentrációkban a TCEP nem tűnt annyira destruktívnak, a nitrozoperszulfid lassú bomlása miatt számunkra fontos volt, hogy a melléktermékek eltávolítása viszonylag gyorsan megtörténjen, így ne csökkenjen számottevően az  $\text{SSNO}^-$  koncentrációja.



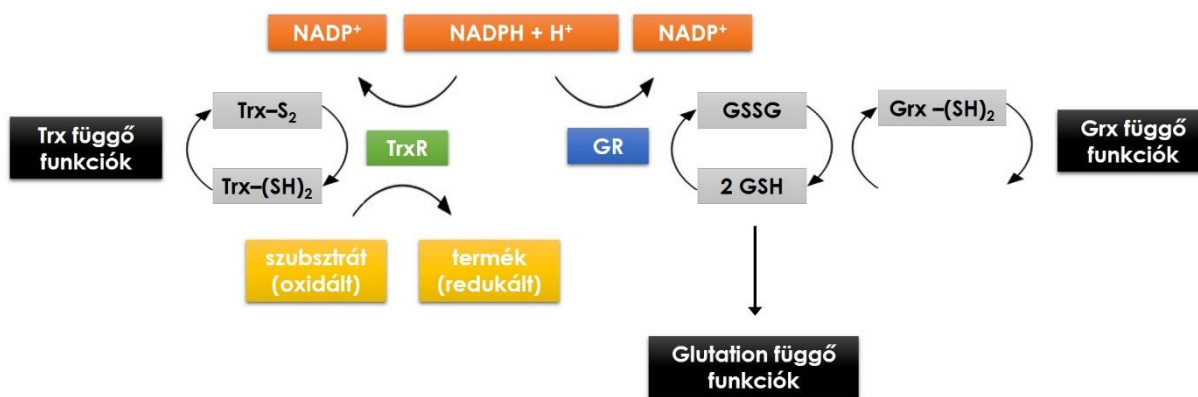
**30. ábra:** TCEP hatása a nitrozoperszulfid 1 mM SNAP : 10 mM  $\text{Na}_2\text{S}$  elegy ( $\sim 300 \mu\text{M}$   $\text{SSNO}^-$ ) stabilitására

Az irodalomból már ismert volt, hogy a diszulfidok redukációjára széles körben használt *D,L*-ditiotreitól (DTT) a nitrozoperszulfidot nem redukálja<sup>6</sup>, így ígéretes redukálószernek tűnhet a poliszulfid melléktermékek eltávolítására. DTT esetében viszont a redukálószer feleslegének eltávolítása jelent problémát. Hogy erre megoldást találjak, megpróbálkoztam a piacon kapható, immobilizált DTT-vel működő redukációs oszlop használatával, azonban kísérleteim során azt tapasztaltam, hogy a poliszulfidok redukciója nem megy végbe kellő hatékonysággal.

### 5.3.3. A tioredoxin és glutation enzimrendszerek hatása nitrozoperszulfid bomlására

Mivel kísérleteim nagy részét biológiai közegekre interpretáltam, felmerült bennem a kérdés, hogy a biológiai rendszerekben működő, rendkívül hatékony redukív rendszerek vajon milyen hatással lennének az SSNO<sup>-</sup> stabilitására?

Kutatócsoportunkban újabban intenzíven tanulmányozzuk a tioredoxin és glutation enzimrendszereket<sup>108-110</sup>, amelyek a sejten belüli diszulfidkötések redukációjáért felelnek, emellett effektíven redukálják a fehérje perszulfidokat, valamint a tioredoxin rendszer az S-nitrozotiolok denitrozilációját is katalizálja (31. ábra).

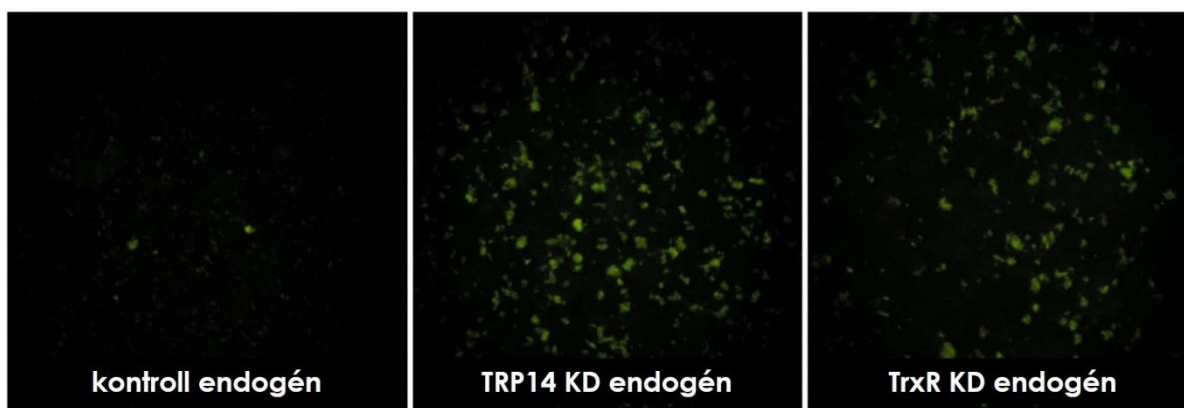


**31. ábra:** A tioredoxin és glutation rendszer működése

(Az ábrát Kuntz AN et al PLOS Medicine (2007)<sup>108</sup> alapján készítettem)

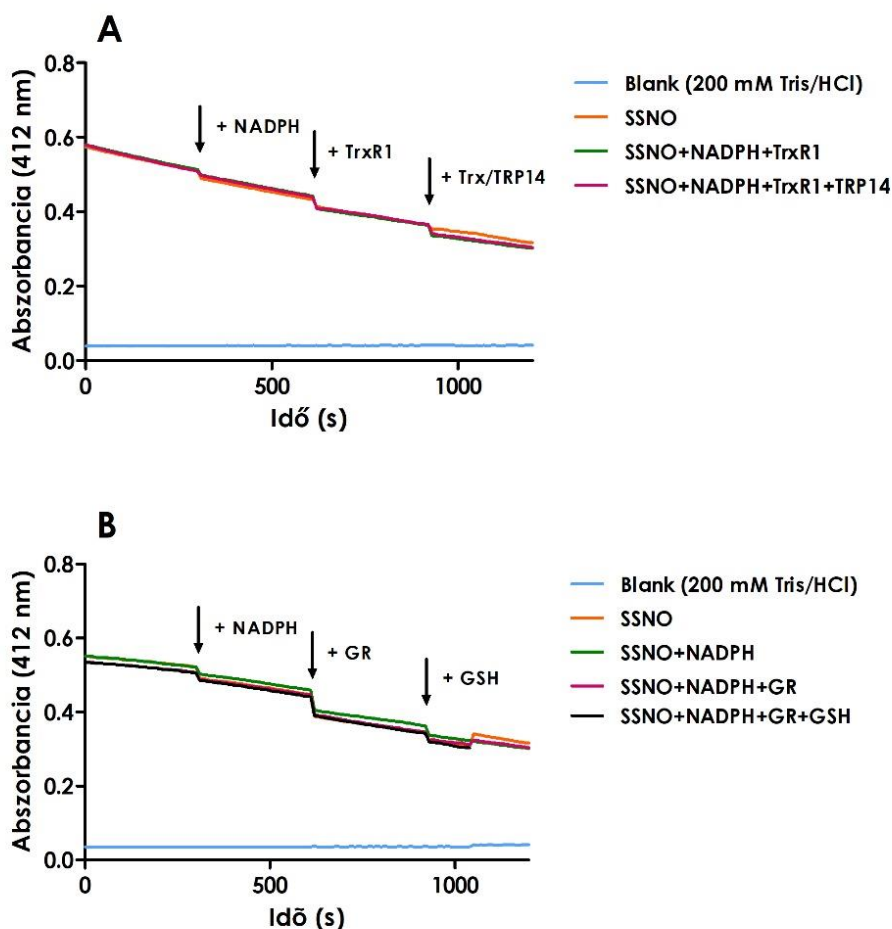
A tioredoxin rendszer szulfán kén tartalmú részecskéket redukáló jelentőségéről egy HEK293 sejteken végzett kísérlet során is meggyőződtem: normál kontroll, valamint TrxR illetve TRP14 csendesített sejtvonalakat inkubáltam egy szulfán kén specifikus festékkel (SSP4), majd a festék feleslegének lemosása után mikroszkóppal tanulmányoztam a fluoreszcenciát, amely kezelés hiányában az endogén szulfán kén tartalommal arányos. Ahogy a 32. ábra is szemlélteti, a csendesített sejtekben jóval intenzívebb fluoreszcens jelet detektáltam, amely arra enged következtetni, hogy ezekben a sejtvonalakban a tioredoxin rendszer csökkent működése a különböző szulfán kén tartalmú módosulatok (perszulfidok, polisulfidok) felhalmozódásához vezetett, míg a normál kontroll sejtekben az enzimrendszer hatékonyan redukálta ezeket a származékokat.





**32. ábra:** Endogén szulfán kén tartalom változása normál kontroll, valamint TrxR és TRP14 csendesített HEK293 sejtekben

Az enzimrendszerek hatását két szempontból is fontosnak tartottam megvizsgálni: kérdéses volt, hogy a már hatékonynak bizonyult poliszulfid redukció  $SSNO^-$  jelenlétében hogyan zajlik, valamint  $SSNO^-$  jelenlétében szelektív-e, ugyanis ha a nitrozoperszulfid nem „él túl” egy ilyen redukzív közeget, akkor csak rövid ideig, legfeljebb átmeneti jelleggel vehet részt jelátviteli reakciókban. Ennek tanulmányozásához külön-külön is megvizsgáltam az enzimrendszerek egyes komponenseinek (NADPH, TrxR1, Trx/TRP14 illetve NADPH, GR, GSH) hatását az  $SSNO^-$  stabilitására. Ahogy a 33. ábrán látható, a kinetikai görbék között nem figyelhető meg számottevő különbség, azaz sem a tioredoxin, sem a glutation rendszer komponensei nincsenek hatással a nitrozoperszulfid stabilitására, azaz nem redukálják azt. Ezért az  $SSNO^-$  biológiai hatásának tanulmányozása során végzett kísérleteimben az előállítás melléktermékeiként keletkező szerves poliszulfidokat enzimatis redukció útján távolítottam el a reakcióelegyből (15 perc inkubálás 200 nM TrxR1 és 2 mM NADPH mellett), melyet követően a fehérjét ultracentrifuga segítségével választottam el a tisztított elegytől. Ez a felfedezés egyben rendkívül fontos biokémiai következményt is jelent, ugyanis az  $SSNO^-$  ellenállva a szervezetben működő enzimrendszerek redukzív kapacitásának, szulfán kén transzfer molekulaként funkcionálhat, lassú bomlása pedig szerves poliszulfidok képződését eredményezi, amelyek cisztein-poliszulfid poszttranszlációs módosulatok generálásán keresztül vesznek részt jelátviteli folyamatokban.



**33. ábra:** A tioredoxin és glutation rendszerek hatása SSNO<sup>-</sup> stabilitására

**A:** ~ 100 μM SSNO<sup>-</sup> ± 5 mM NADPH ± 100 nM TrxR1 ± 20 μM TRP14

**B:** ~ 100 μM SSNO<sup>-</sup> ± 5 mM NADPH ± 1 μM GR ± 10 mM GSH

pH = 7,40; szobahőmérséklet

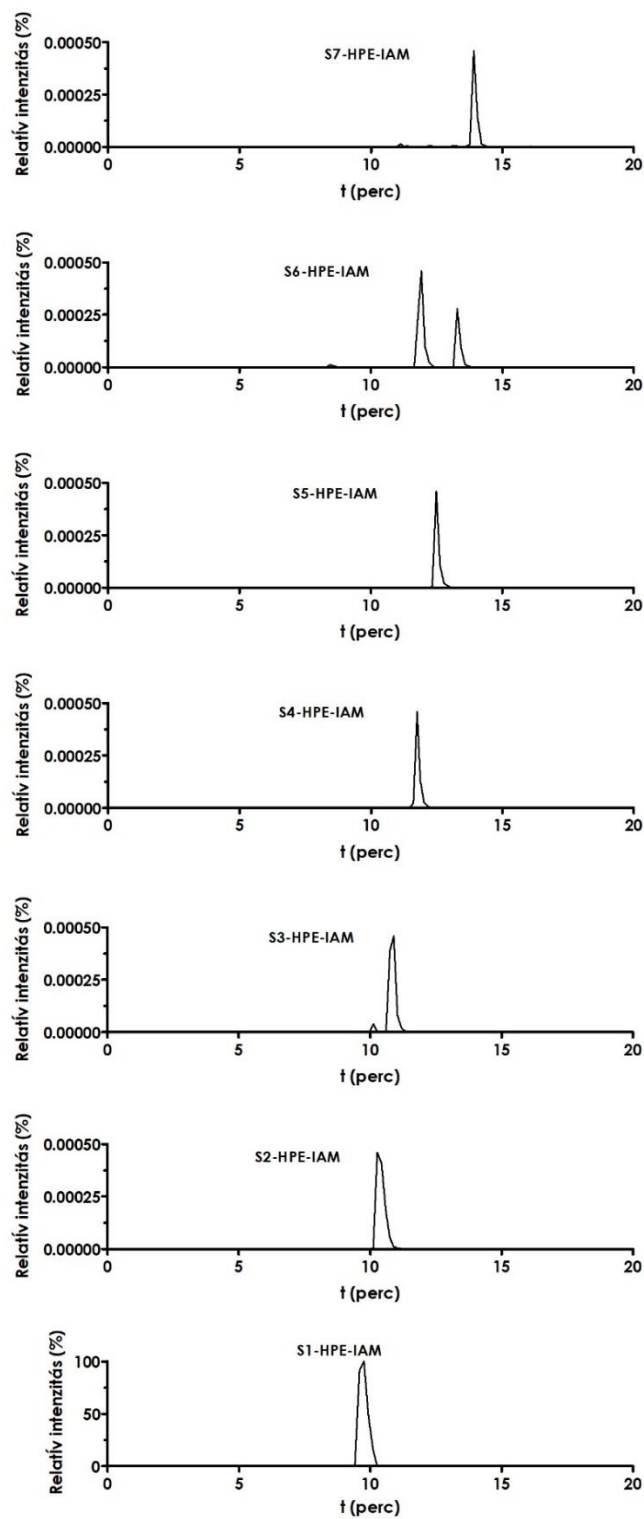
### 5.3.4. Nitrozoperszulfid általi késleltetett perszulfidifáció és polisulfidifáció

#### 5.3.4.1. Szervetlen polisulfidok képződése nitrozoperszulfid bomlása során

A szakirodalomban az SSNO<sup>-</sup> bomlásával kapcsolatosan közölt kísérletek csak annyit igazoltak, hogy oxidált, szulfán kén tartalmú részecskék keletkeznek, azonban kémiai identitásukról nem áll rendelkezésünkre információ, ugyanis az azonosításra alkalmazott hideg cianolízis, illetve a redukció utáni szulfid detektálás az összes szulfán kén tartalmú részecskét méri. Feltételezésünk szerint a nitrozoperszulfid bomlása szervetlen polisulfidok képződésével

jár, melyek bioaktivitása mára már elfogadott. Ennek tisztázására LC/MS kísérletek során szerettem volna meggyőződni a bomlás során keletkező poliszulfidok jelenlétéről.

A bomlás során keletkező szerves poliszulfidok meghatározásához az SSNO<sup>-</sup> tartalmú reakcióelegy elkészítését követően mintát vettem a szobahőmérsékleten, fénytől védve két órán keresztül inkubált elegyből, majd HPE-IAM-mal végeztem alkilálást a poliszulfidok stabilizálása végett. Ezt követően a mintákat tömegspektrometriával kombinált folyadékkromatográfiás analízisnek vetettük alá és detektáltuk a szerves poliszulfid-HPE-IAM adduktok megjelenését. Ahogy a 34. ábrán látható, 1–7 kénatomszámú adduktokat sikerült detektálnunk az SSNO<sup>-</sup>-t tartalmazó rendszerben, amely jelen állás szerint ez a nitrozoperszulfid képződése és bomlása során keletkezett szerves poliszulfidok összege. A szerves poliszulfidok nitrozoperszulfid általi, időben elnyújtott kibocsátását és stabilitását ezért a jövőben ugyanilyen kísérleti körülmények között tervezem tanulmányozni, összehasonlítva a poliszulfid sókból készített kontroll oldatok stabilitásával.



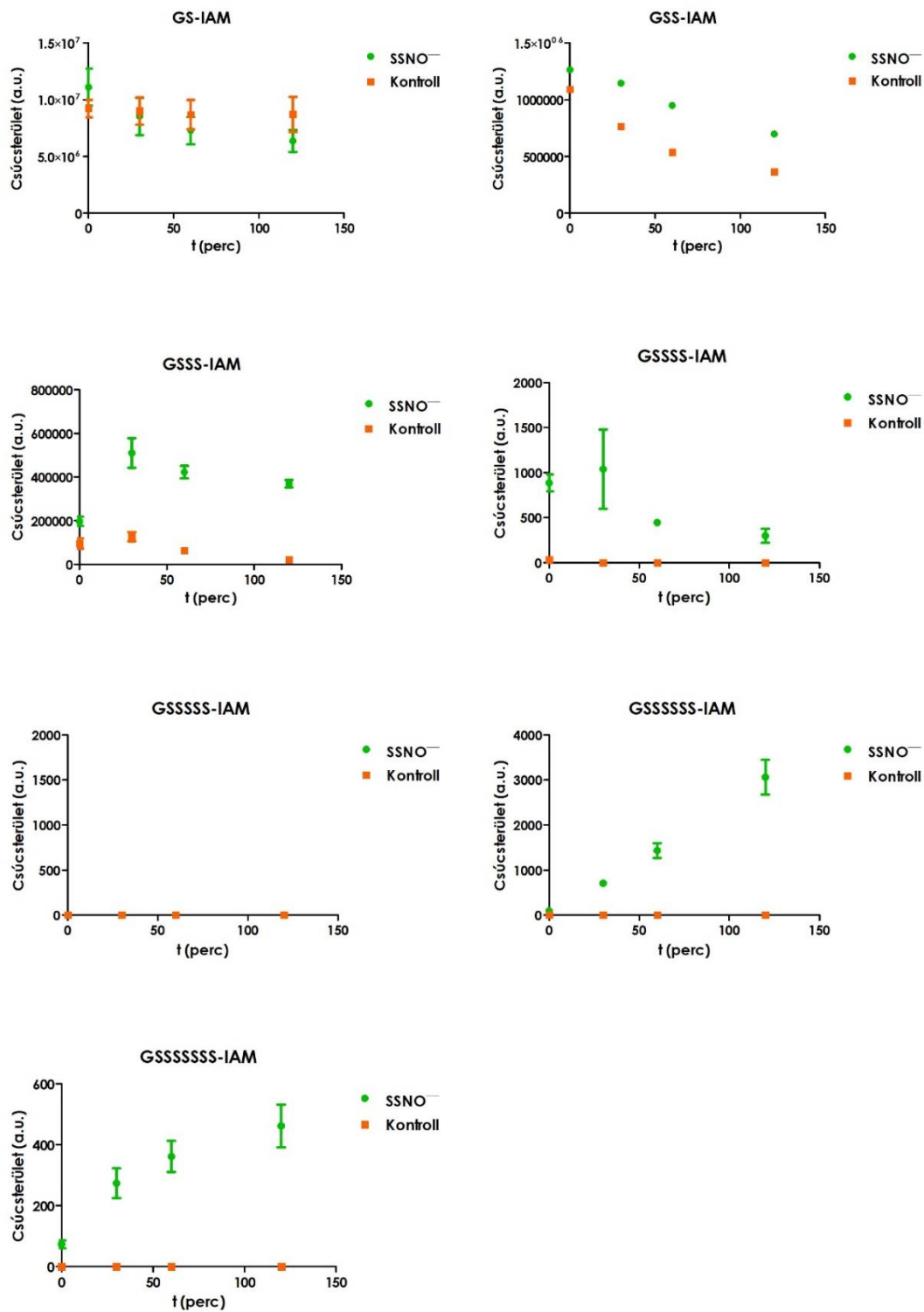
**34. ábra:** Szervetlen poliszulfid – HPE–IAM adduktok detektálása nitrozoperszulfid oldat bomlása után

A termékek mennyiségét az S1–HPE–IAM addukt mennyiségéhez képest számított relatív csúc alatti területben fejeztük ki

#### 5.3.4.2. Késleltetett poliszulfidáció redukált glutationon

A nitrozoperszulfid általi késleltetett poliszulfidáció tanulmányozásához első modellként egy kis molekulatömegű tiolt, a redukált glutationt (GSH) választottuk. Az  $SSNO^-$  általi hatás tanulmányozásakor mindenképpen szükséges volt egy kontroll rendszer vizsgálata is, hiszen ha tisztítás hatásfoka nem 100%, a melléktermékként keletkező szulfid és poliszulfid habár csekély mennyiségben, de jelen lesz a tisztított  $SSNO^-$ -t tartalmazó oldatban. Ezek pontos koncentrációját az adott koncentrációjú  $SSNO^-$ -t tartalmazó reakcióelegyből határoztam meg metilénkék<sup>24</sup> illetve hideg cianolízis<sup>31</sup> módszerek segítségével. Az analízis eredménye alapján a kontroll oldat 500  $\mu$ M szerves poliszulfidot és 9 mM szulfidot tartalmazott  $Na_2S_2$  és  $Na_2S$  formájában, az elkészítést követően pedig ugyanannak az enzimatisztítási protokollnak vettem alá, mint a SNAP és szulfid reakciójával kapott elegyet.

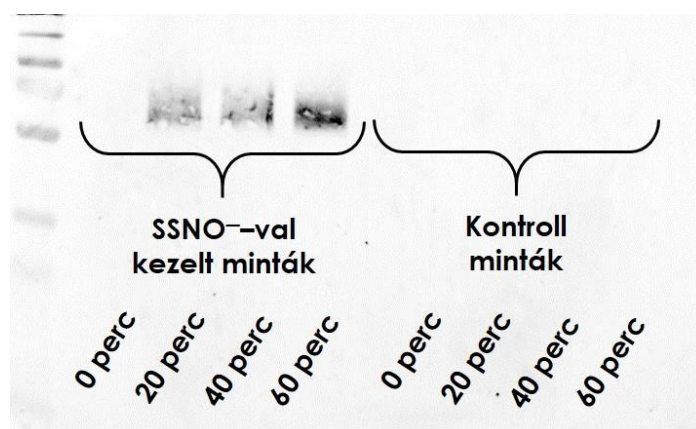
A GSH-t a poliszulfid és szulfid melléktermékektől többnyire megtisztított  $SSNO^-$  illetve kontroll oldatokkal kezeltük, majd a reakcióelegyekből adott időközönként mintát vettünk, melyeket a poliszulfidált módosulatok stabilizálása végett jóacetamiddal (IAM) alkiláltunk. Az alkilálást követően a mintákat tömegspektrometriával kombinált folyadékkromatográfiás analízisnek vetettük alá és detektáltuk a poliszulfidált glutation módosulatok időbeli megjelenését. Ahogy a 35. ábra is mutatja, mindegyik lánchossz esetében több adduktot sikerült detektálnunk az  $SSNO^-$ -val kezelt mintákban, különösen a hosszabb lánccú  $GS(S)_n$ -IAM módosulatokat tekintve, amelyek képződése rendkívül szép időfüggést is mutatott. Ez a megfigyelés megerősíti, hogy a melléktermékként keletkező szerves poliszulfidok csupán átmeneti poliszulfidációt idéznek elő ellenben a nitrozoperszulfiddal, amely időben elnyújtva fejt ki hatását, szerves poliszulfid bomlástermékei által.



**35. ábra:** Poliszulfidált glutation módosulatok detektálása redukált glutation nitrozoperszulfidos kezelését követően: SSNO<sup>-</sup> kezelés hatására megnövekedett mennyiségű GS(S)<sub>n</sub>-IAM addukt detektálható a szervesen poliszulfidokat és szulfidot tartalmazó kontroll oldathoz hasonlítva

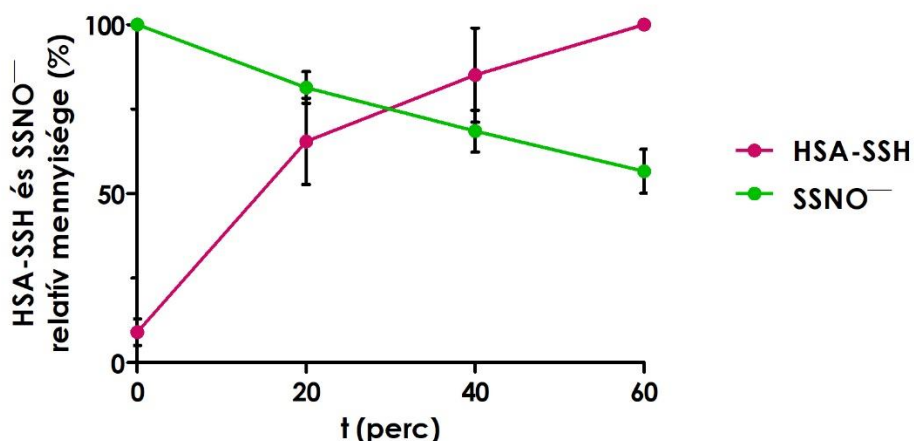
### 5.3.4.3. Késleltetett perszulfidáció humán szérum albuminon

A késleltetett poliszulfidáció tanulmányozását humán szérum albumin modellfehérjén is elvégeztem, amely fehérje egyetlen szabad tiolcsoportja révén ideális modell lehet a fehérje tiolokon végbemenő módosítások vizsgálatához. A fehérje előredukcióját követően, tisztított SSNO<sup>-</sup> illetve kontroll oldattal végeztem a kezelést, majd adott időpontokban mintát vettem a reakcióelegyekekből, melyekből a bevezetőben már említett ProPerDP módszer segítségével detektáltam a fehérje cisztein–perszulfidokat. A kísérlet végrehajtása a disszertáció 4.2.4.4. fejezetében ismertetett körülmények között történt. Ahogy a 36. ábrán látható, a nitrozoperszulfidos kezelés során az inkubálási idő előrehaladtával nőtt a humán szérum albumin–perszulfid (HSA–SSH) mennyisége, míg a kontroll minták nem tartalmaztak detektálható mennyiségű perszulfid módosulatot, amely egyben a tisztítás hatékonyságát is alátámasztja. Azaz, a NADPH/TrxR1 rendszer hatékonyan redukálta az SSNO<sup>-</sup> előállítás során képződő szervesen poliszulfidokat, így eltávolítását követően csak az SSNO<sup>-</sup> bomlása során kibocsátott szervesen poliszulfidok idézheték elő a detektált HSA–SSH módosulatok megjelenését.



**36. ábra:** Humán szérum albumin perszulfid detektálása humán szérum albumin nitrozoperszulfidos kezelését követően

Kvantitálva a sávok intenzitását, a HSA–SSH időben növekvő mennyisége konzisztensnek mutatkozott az SSNO<sup>-</sup> mennyiségének időbeli csökkenésével, alátámasztva a nitrozoperszulfid általi indirekt, elnyújtott hatást (37. ábra).



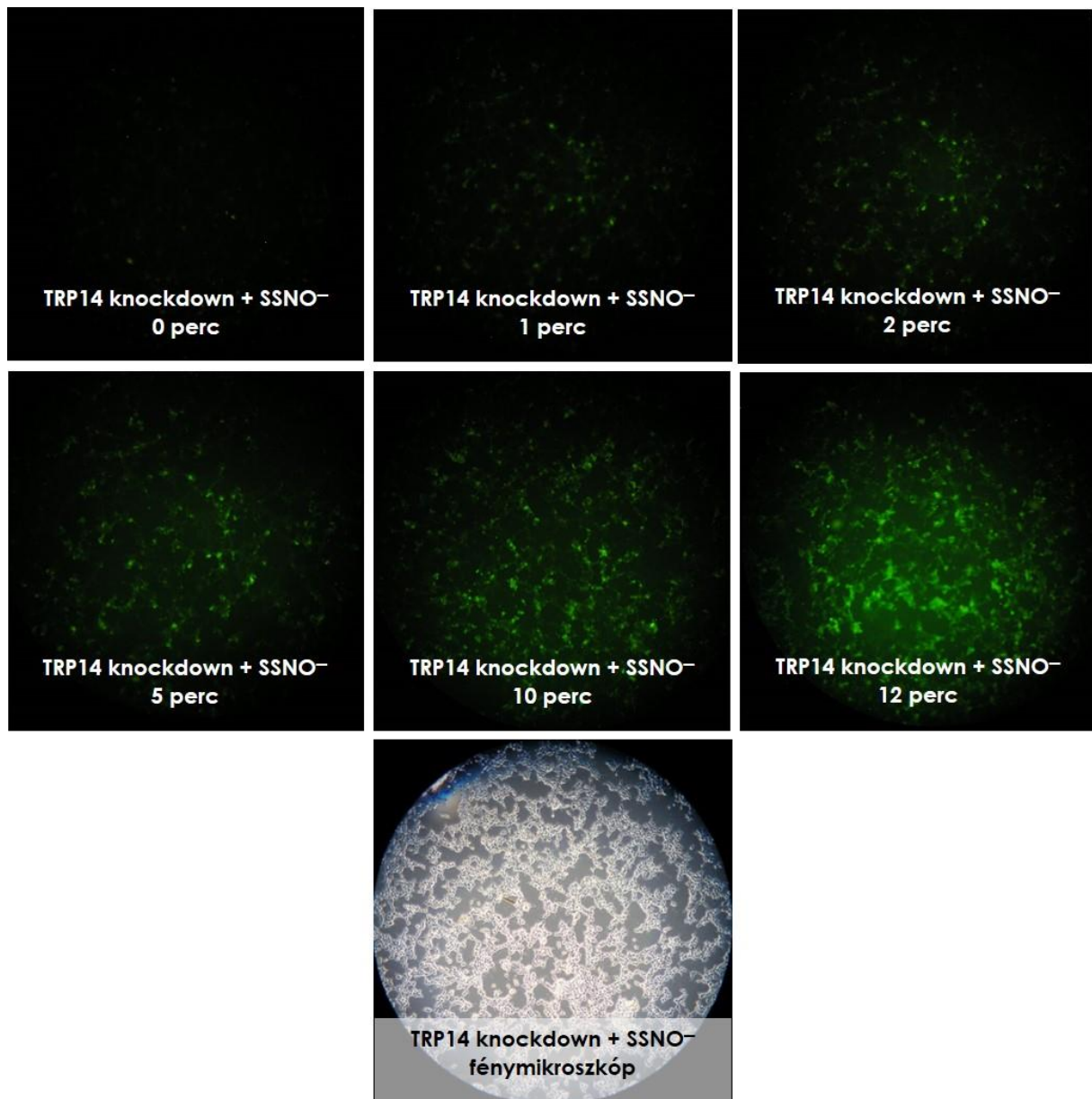
**37. ábra:** A humán szérum albumin perszulfid (HSA–SSH) keletkezésének és a nitrozoperszulfid bomlásának kinetikai viszonya

A HSA–SSH képződési kinetikája párhuzamot mutat az SSNO<sup>-</sup> bomlásával, alátámasztva az általunk feltételezett közvetett perszulfidációs hatást (a mérési pontok és a hozzájuk tartozó hibásávok n = 3 független kísérleti eredmény átlagát és szórását (SD) reprezentálják)

#### 5.3.4.4. Késleltetett poliszulfidáció HEK293 sejteken

Nem csak a tioredoxin rendszer működését, de a nitrozoperszulfid szulfán kén donor tulajdonságát is tanulmányoztuk HEK293 sejteken, amely kísérlethez a TRP14 csendesített sejtvonalat választottuk. A sejteket első lépésben SSP4-gyel inkubáltam az endogén szulfán kén tartalom meghatározására végzett kísérlethez hasonlóan, majd a festék feleslegének lemosása után tisztított SSNO<sup>-</sup>-val kezeltem őket, és mikroszkóppal tanulmányoztam a fluoreszcencia időbeli változását. Ahogy a 38. ábra szemlélteti, az SSNO<sup>-</sup> időben növekvő fluoreszcens jelet idézett elő a sejteken, amely arra enged következtetni, hogy a szulfán kén tartalmú módosulatok (perszulfidok, poliszulfidok) mennyisége az idő előrehaladtával folyamatosan nőtt. Ez arra utalhat, hogy az SSNO<sup>-</sup> sejten belüli per- és/vagy poliszulfidációt idézhet elő, de ennek kétséget kizáró tisztázására további kísérletek elvégzése indokolt.





**38. ábra:** Szulfán kén tartalmú módosulatok késleltetett megjelenése HEK293 sejtek nitrozoperszulfidos kezelését követően

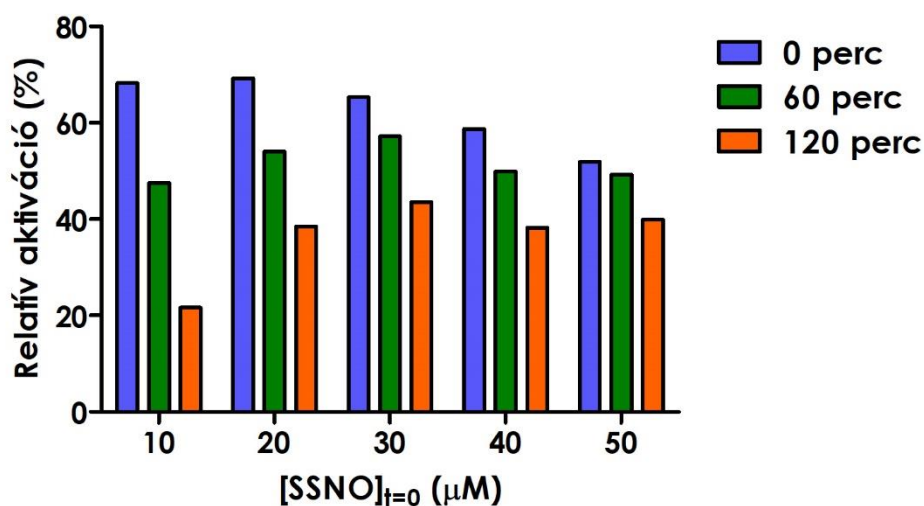
#### 5.3.4.5. Késleltetett poliszulfidáció TRPA1 ioncsatornákon

A PTE-ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézettel közösen vizsgáltuk az SSNO<sup>-</sup> *transiens receptor potenciál ankyrin 1* (TRPA1) receptorokra gyakorolt hatását. Az irodalmi áttekintésben említették fényében kísérleteim során azt vizsgáltam, hogy a TRPA1 receptorok aktivációjának tekintetében nitrozoperszulfidos kezelést követően az azonnali hatás mellett

megfigyelhető-e időben elnyújtott aktiváció. Ennek jelenléte ugyanis arra utalhat, hogy az SSNO<sup>-</sup>-nak biológiai szerepe van a szulfid és NO vezérelt jelátvitel összefonódásában.

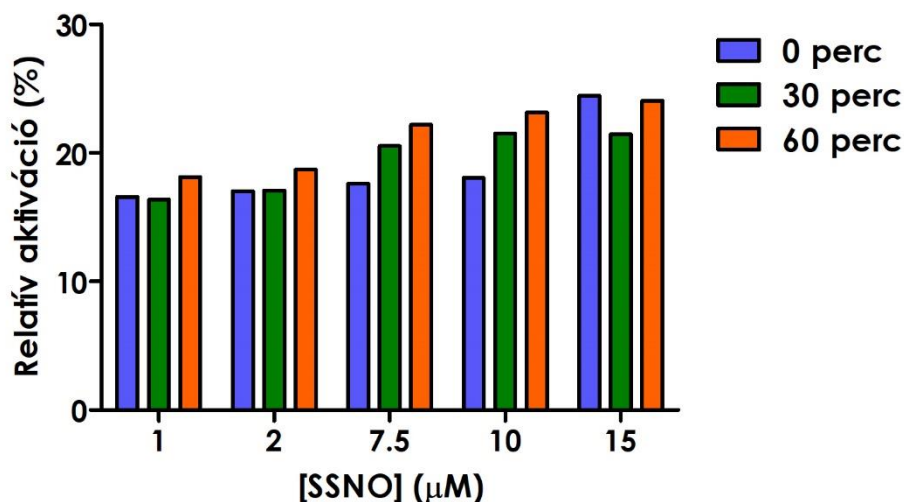
Előkísérleteink során TRPA1-et expresszáló, valamint TRPA1 negatív CHO sejteken vizsgáltuk a melléktermékektől nagymértékben megtisztított SSNO<sup>-</sup>, illetve a kontroll elegy hatásának idő- és koncentrációfüggését. A jelintenzitás értékeket minden esetben a referenciaként alkalmazott 100 μM mustárolajra vonatkoztattuk és az így kapott relatív aktivációt ábrázoltuk a koncentráció és az idő függvényében.

Az általunk feltételezett késleltetett aktiváció teljesülése esetén a kísérletek során azt vártuk, hogy a csak poliszulfidot és szulfidot tartalmazó kontroll oldat esetében az idő előrehaladtával az aktiváció mértéke csökkenő tendenciát fog mutatni, ugyanis az S-nitrozo-N-acetil-DL-penicillamin és szulfid reakciójakor *in situ* keletkező szulfid és poliszulfidok nem stabilak, ezáltal csak átmeneti, gyors aktivációt eredményeznek. Ahogy a 39. ábra szemléleti, a kontroll oldattal kezelt sejtekben az aktiváció mértéke időben lecsengő tendenciát mutatott, megerősítve az átmeneti aktivációt. A TRPA1 deficiens CHO sejtek egyik esetben sem reagáltak a kezelésre, amely megerősíti azt, hogy az általunk detektált Ca<sup>2+</sup> beáramlás specifikusan, a TRPA1 aktiváció következtében jelenik meg.



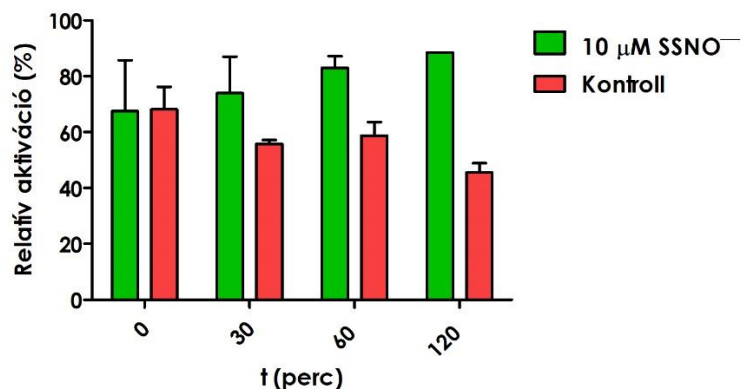
**39. ábra:** TRPA1 expresszáló CHO sejtek reakciója kontroll oldattal (500 μM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, 9 mM Na<sub>2</sub>S) történő kezelésre

Ezzel szemben, az SSNO<sup>-</sup>-val kezelt sejteken az idő előrehaladásával növekvő mértékű, vagy elnyújtott aktivációra számítottunk, hiszen a bomlás az aktiváló ágens poliszulfidok képződését eredményezi.



**40. ábra:** TRPA1 expresszáló CHO sejtek reakciója nitrozoperszulfidos kezelésre

Ahogy a 40. ábrán látható, a sejtek nitrozoperszulfidos kezelését követően detektált Ca<sup>2+</sup>-influx időfüggése elnyújtott aktivációra enged következtetni, azaz az SSNO<sup>-</sup> potenciális bioaktivitással rendelkezhet a TRPA1 ioncsatornák aktivációjának tekintetében. A kontroll kísérletekhez hasonlóan, a TRPA1 deficiens CHO sejtek ebben az esetben sem mutattak reakciót, megerősítve a specifikus, TRPA1 aktivációhoz kapcsolódó jelet. Az elnyújtott hatásra utaló időfüggés 7,5 illetve 10 μM tisztított SSNO<sup>-</sup> esetén volt a legszemléletesebb, így a következőkben a kísérlet finomhangolásaként 10 μM nitrozoperszulfidra, illetve a hozzá tartozó kontroll oldatra fókuszálva ismételtük meg a méréseket, 120 perc inkubálási időt alkalmazva. Az SSNO<sup>-</sup> előállítását tekintve, az előbbieken alkalmazott SNAP helyett S-nitrozoglutationt (GSNO) használtam, ugyanis tapasztalataink alapján az SSNO<sup>-</sup> mix SNAP-szulfid reakcióval történő előállításakor melléktermékként keletkező N-acetil-DL-penicillamin (NAP) nem várt TRPA1 antagonistá hatással kell számolnunk. Így a következő kísérletben az SSNO<sup>-</sup> mix előállítása 1 mM GSNO és 10 mM Na<sub>2</sub>S reakciójával történt, míg a kontroll elegy előállítását, az elegyek tisztítását, a sejtek kezelését és a Ca<sup>2+</sup> beáramlás detektálását a korábbiakkal megegyező módon hajtottam végre.



**41. ábra:** TRPA1 expresszáló CHO sejtek reakciója 10 μM tisztított SSNO<sup>-</sup>-val, valamint a hozzá tartozó kontroll oldattal történő kezelésre

Ahogy a 41. ábra is mutatja, a kontroll oldattal kezelt sejtekben az aktiváció mértéke az idő előrehaladtával csökkent, egyetértésben az előző kísérlet eredményeivel, amely arra enged következtetni, hogy az előállítás során in situ keletkező szervesetlen poliszulfidok nem stabilak, így csak az ioncsatornák átmeneti aktivációját tudják előidézni. Ezzel szemben, a tisztított SSNO<sup>-</sup>-val kezelt sejtekben a relatív aktiváció növekvő tendenciát mutatott, amely megerősíti az általunk feltételezett elnyújtott aktivációt.

## 6. Összefoglalás

Doktori kutatásom fókuszában a cisztein tiol oldalláncokon végbemenő poliszulfidációs reakciók vizsgálata állt. Munkám során átfogóan tanulmányoztam a reaktív kénszármazékok detektálása során alkalmazott alkiláló ágensek speciációra gyakorolt hatását és a poliszulfénsavak dimedonos detektálását, valamint a szulfid és nitrogén-monoxid közötti kölcsönhatás egyik fő köztiterméke, a nitrozoperszulfid általi elnyújtott perszulfidáció és poliszulfidáció vizsgálatával is foglalkoztam.

A szervesetlen poliszulfidok oldatbeli speciációját tanulmányozva megállapítottuk, hogy az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között a részecskék eloszlása nem függ a kiindulási formától, ugyanis a különböző összetételű poliszulfid sók oldatba kerülését követően dinamikus redox egyensúlyi reakcióik következtében a speciációt gyors egymásba alakulásuk határozza meg. Ezt a következtetést a GAPDH fehérjén végzett kísérleteink eredményei is megerősítették, ugyanis az eltérő kiindulási poliszulfid sók alkalmazása ugyanazt a mintázatot eredményezte a poliakrilamid géleken. A mintázat a negatív kontroll, poliszulfiddal nem kezelt fehérje esetén is megegyezett a poliszulfidált mintakéval, ami arra enged következtetni, hogy a GAPDH tiol oldalláncai alapállapotban is poliszulfidált formában vannak.

Ha a reaktív kénszármazékok detektálását származékképzést követően végezzük – amely lépés elengedhetetlen a reaktív és instabil részecskék stabil származékká alakításához – a származékképző ágens természete befolyásolja a szervesetlen poliszulfidok speciációját, és szignifikáns különbség figyelhető meg az egyes alkilálószer között. Egy szisztematikus, átfogó tanulmányban szervesetlen poliszulfid, cisztein, glutation és GAPDH modellek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a széles körben alkalmazott, rendkívül erős elektrofil N-etilmaleimid (NEM) nem csak a poliszulfid láncok végén lévő, hanem a láncközi kénatomokra is támadva elhasítja a poliszulfid láncokat. Ez a hasítás lejátszódhat akár egy előzetes alkilálást követően, így NEM alkalmazása során mind a koncentráció, mind az inkubálási idő fontos paraméterek a detektált részecskék speciációját illetően, ugyanis növelésükkel a lánchasítás mértéke is nő. GAPDH poliszulfidációját, majd a poliszulfidált láncok NEM általi hasítását tanulmányozva megmutattuk, hogy ez az ágens az összes poliszulfid oldalláncot elhasítja. Ezzel szemben megállapítottuk, hogy egy másik, rendkívül elterjedt alkiláló ágens, a jódcetamid (IAM), illetve hidroxifenil származékának (HPE–IAM) alkalmazása nem vezet a poliszulfidok lánchasításához, így ezek jobb reagensek a nagyobb kénatomszámú, hosszabb láncú módosulatok detektálására. Egy harmadik alkilálószer, monobromobimánt (MBB) alkalmazva

megállapítottuk, hogy ez az ágens is elhasítja a hosszabb láncú poliszulfidált módosulatokat, azonban NEM-nél gyengébb elektrofil karaktere miatt koncentrációja kevésbé befolyásolja a speciációt. A kis molekulatömegű tiolok poliszulfidációjának és alkilálásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a glutationból képződő módosulatok stabilabbak, és ezen származékok NEM általi hasítása nem olyan számottevő, mint a cisztein-poliszulfidok esetén.

A poliszulfidok alkilálás általi lánchasításának mechanizmusát tanulmányozva fontos felfedezésre jutottunk a szulfénsavak dimedonos detektálására vonatkozóan, amely korábbi eredményeinkkel is egyetértésben áll. A dimedon által detektált (poli)szulfénsavak oxidáció, illetve az alkilált származékok hidrolízise útján keletkeznek. Kísérleteim során GAPDH peroxidos és poliszulfidos kezelése, majd a származékok dimedonos detektálása után a poliszulfiddal kezelt mintákban azonosítottunk több dimedon adduktot. Ez arra enged következtetni, hogy a korábban kizárólag szulfénsavként azonosított, dimedonnal jelölt származékok nagy része valójában poliszulfidált módosulatokat reprezentál.

A cisztein tiolok poliszulfidációját a szulfid és nitrogén-monoxid kölcsönhatás egyik fő köztiterméke, a nitrozoperszulfid vonatkozásában is tanulmányoztam. Az S-nitroso-N-acetil-DL-penicillamin és feleslegben lévő szulfid reakciójában előállított reakcióelegy kémiai és kinetikai karakterizálása során igazoltam, hogy ugyanazt a részecskét tartalmazza, amelyet korábban Seel és munkatársai, valamint Wedmann és munkatársai is nitrozoperszulfidként azonosítottak. Az előállítás során melléktermékként keletkező szervesetlen poliszulfidok szelektív redukciójának tanulmányozása során megállapítottam, hogy a kereskedelmi forgalomban is kapható, széles körben alkalmazott redukálószer (TCEP, DTT) nem szelektív, vagy nem elegendően hatékonyak. Ellenben két, biológiai rendszerekben működő redukzív enzimrendszer (tioredoxin rendszer, glutation rendszer) hatását is vizsgáltam, melynek során megmutattam, hogy egyik enzimatis rendszer komponensei sincsenek hatással a nitrozoperszulfid stabilitására és bomlására, azaz ideálisak lehetnek a szervesetlen poliszulfidok szelektív és hatékony redukciójára SSNO<sup>-</sup> mellett.

LC/MS kísérleteink igazolták, hogy a nitrozoperszulfid lassú és folyamatos bomlása szervesetlen poliszulfidok képződését eredményezi, ezáltal pedig az SSNO<sup>-</sup> kikerülve az előbb említett tioredoxin és glutation rendszereket, szulfán kén transzfer molekulaként funkcionálhat a tiolok elnyújtott poliszulfidációját előidézve.

Az SSNO<sup>-</sup> általi elnyújtott poliszulfidációt több biológiailag is releváns modellen megmutattuk: redukált glutation SSNO<sup>-</sup> kezelését követően, LC-MS analízist alkalmazva 1–7 kénatomot

tartalmazó poliszulfidált módosulatokat detektáltunk, amelyek időfüggő képződése megerősíti az SSNO<sup>-</sup> bomlása során képződő szerves poliszulfidok általi hatást.

Humán szérumban albumin nitrozoperszulfidos kezelését, majd a fehérje–perszulfidok detektálására alkalmas ProPerDP eljárást alkalmazva időben növekvő humán szérumban albumin–perszulfid mennyiséget sikerült kimutatnunk, amely korrelált az SSNO<sup>-</sup> időben csökkenő mennyiségével, szintén megerősítve a nitrozoperszulfid általi elnyújtott perszulfidációt.

Az SSNO<sup>-</sup> szulfán kén donor tulajdonságát sejtes rendszeren is igazoltuk. A szulfán kénre specifikus SSP4 festékkel előzetesen megfestett TRP14 csendesített HEK293 sejteket nitrozoperszulfiddal kezelve időben növekvő fluoreszcens jelet detektáltunk, amelynek intenzitása egyenes arányban áll az SSNO<sup>-</sup> bomlás során keletkező szulfán kén mennyiségével. A nitrozoperszulfid által kibocsátott szerves poliszulfidok hatását a TRPA1 receptorok aktivációjának tanulmányozásán keresztül is megvizsgáltuk. A receptort stabilan expresszáló CHO sejtek SSNO<sup>-</sup> -val való kezelését követően áramlási citometriával követtük a Ca<sup>2+</sup> influx változását, amely az ioncsatornák aktivációjával arányos. Kísérleteink során az idő előrehaladtával növekvő aktivitást figyeltünk meg, amely újabb bizonyítékot szolgáltatott az SSNO<sup>-</sup> általi késleltetett, indirekt hatásra. A receptort nem expresszáló, TRPA1 deficiens sejtek kezelése nem eredményezett Ca<sup>2+</sup> beáramlást, amely megerősítette, hogy az általunk detektált jel az ioncsatornák aktivációjához rendelhető.

Mind a négy modellrendszer esetében végeztünk kísérleteket kontroll oldattal, amely az előállítás során melléktermékként keletkező, a tisztítás során pedig nem eltávolítható szulfid és poliszulfidok jelenlétét reprezentálta. A kontroll oldat alkalmazása legfeljebb átmeneti, időben csökkenő hatást idézett elő az összes rendszer esetében, amely arra enged következtetni, hogy a melléktermékként keletkező reaktív részecskék csupán tranziens hatást tudnak kiváltani, így jelátviteli folyamatokban nem relevánsak a nitrozoperszulfiddal ellentétben, amely időben elnyújtott hatást indukál szerves poliszulfid bomlástermékei által.

## 7. Summary

During my PhD research work I studied the polysulfidation reactions of cysteine thiols. A comprehensive analysis was performed to study the effects of various alkylating agents on the speciation of reactive sulfur species, as well as the dimedone based detection of polysulfenic acids. Along with our polysulfide detection analysis, a detailed study was carried out regarding the delayed persulfidation and polysulfidation reactions induced by nitrosopersulfide, which was found to be a main intermediate of chemical interactions between nitric-oxide and hydrogen-sulfide.

Concerning the solution chemistry of inorganic polysulfides we found that under the applied experimental conditions, their speciation did not depend on their initial source due to their dynamic redox equilibrium reactions, which take place after dissolution of various polysulfide salts. This observation was further corroborated by our polysulfidation experiment on GAPDH, when the application of different polysulfide salts resulted in similar pattern on the SDS-PAGE gels. A similar pattern was observed with respect to the untreated protein – used as negative control – as well, suggesting that the thiol residues of GAPDH were already polysulfidated.

When derivatization was used for the detection of these sulfur species – which is necessary, in order to form stable modifications of these unstable and reactive species – we found that the nature of the applied alkylating agent made a difference in the speciation of inorganic polysulfides. A comprehensive and systematic study was performed on inorganic polysulfides, cysteine, glutathione and GAPDH and our observations suggested that the widely used, strong electrophile N-ethylmaleimide (NEM) cleaves the polysulfide chains due to the attack of midchain sulfur atoms. Thus, both the incubation time and the concentration of NEM are crucial with respect to the speciation of the detected species, as the extent of polysulfide cleavage is increased with increasing incubation time and NEM concentration. Studying the polysulfidation reactions and the NEM induced cleavage of the polysulfidated chains of GAPDH, our observations suggested that NEM cleaved all polysulfide chains on the protein. On the contrary, the application of another widely used alkylation agent, iodoacetamide (IAM) and its hydroxyphenyl analogue (HPE-IAM) was not found to lead to polysulfide cleavage to a great extent under the applied conditions, making them ideal agents for the detection of longer chain polysulfides. Regarding these alkylating agents, incubation time and concentration made only a slight difference in the speciation of the detected species. When another alkylating agent, monobromobimane (MBB) was used, certain polysulfide cleavage was observed, however the



concentration of the agent did not make a significant impact on the speciation due to its weaker electrophile character. During the polysulfidation and the alkylation study of low molecular weight thiols, glutathione derivatives were found to be more stable than the corresponding cysteine derivatives, and the NEM induced cleavage of these occurred to a lesser extent, suggesting that the nature of the initial cysteine residue is also relevant concerning the observed speciation.

When the alkylation induced polysulfide cleavage was studied, an important issue was discovered regarding the dimedone based detection of sulfenic acids. Dimedone detected (poly)sulfenic acids can be generated via oxidation processes or during the hydrolysis of previously alkylated polysulfide derivatives. When isolated GAPDH, previously treated with hydrogen peroxide and inorganic polysulfides was incubated with dimedone, more dimedone labeled adducts were detected in the polysulfide treated samples, suggesting that a certain part of the previously identified sulfenic acid pool in biological systems may represent polysulfide species. Different mechanisms were proposed to explain these observations.

Polysulfidation of cysteine thiols was also studied with respect to one of the main intermediates of chemical interactions of sulfide with nitric-oxide, called nitrosopersulfide. When the chemical and kinetic characterization of the reaction mixture, prepared by the reaction of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine and excess sulfide was performed, a species was identified, exhibiting the same characteristic properties that were previously attributed to nitrosopersulfide by Seel and coworkers, as well as Wedmann and his colleagues. When a study was performed regarding the selective reduction of polysulfide byproducts, which are generated during nitrosopersulfide preparation, several problems were observed with respect to the selectivity or the efficiency of the commercially available reducing agents (TCEP, DTT). However, two biological reducing machineries, the thioredoxin and glutathione systems were found to have no effect on the stability and decomposition of nitrosopersulfide, providing a selective and efficient way for the abolishment of inorganic polysulfide byproducts.

The slow and continuous decomposition of  $SSNO^-$  was previously found to induce sulfane sulfur containing species which were suggested to be inorganic polysulfides. Our hypothesis was corroborated by LC/MS experiments, suggesting that by escaping from the reductive capacity of the previously mentioned enzymatic systems, nitrosopersulfide can function as a long range sulfane sulfur trafficking molecule, inducing delayed polysulfidation reactions on cysteine thiols.

SSNO<sup>-</sup> induced polysulfidation was studied on several biologically relevant models. On reduced glutathione, S1-S7 glutathione-polysulfur species were detected upon SSNO<sup>-</sup> treatment by LC/MS analysis and the delayed effects were also corroborated by their time dependent formation.

When human serum albumin was treated with SSNO<sup>-</sup>, time dependent formation of human serum albumin-persulfide was observed using the ProPerDP method, and the increasing amount of HSA-SSH was found to be consistent with the decreasing concentration of nitrosopersulfide, suggesting its sustained persulfidation effects.

The sulfane sulfur donating capacity of SSNO<sup>-</sup> was investigated in a cellular system as well. When TRP14 knockdown HEK293 cells, previously stained with the sulfane sulfur specific SSP4 probe were treated with nitrosopersulfide, increasing fluorescent signal was detected which was proportionate with the amount of the sulfane sulfur species, generated upon SSNO<sup>-</sup> decomposition.

The sustained effect of nitrosopersulfide due to the release of inorganic polysulfides was also studied with respect to the activation of TRPA1 ion channels. Ca<sup>2+</sup> influx – which is consistent with the activation of the receptors by inorganic polysulfides – was measured by flow cytometry on SSNO<sup>-</sup> treated TRPA1 expressing CHO cells. Upon SSNO<sup>-</sup> treatment, a time dependent, increased Ca<sup>2+</sup> signal was observed, providing further evidence for the SSNO<sup>-</sup> induced, indirect activation. The treatment of TRPA1 deficient cells did not lead to any Ca<sup>2+</sup> influx, suggesting that the detected signal is indeed attributed to the activation of these ion channels.

With respect to each models, our experiments were carried out with a „control solution” as well, in order to represent the presence of sulfide and inorganic polysulfides, which are generated as byproducts during SSNO<sup>-</sup> preparation, but can not be completely abolished from the reaction mixture. With this solution, only short-term, transient effects were observed, indicating that these reactive species, can only promote temporary effects in contrast with nitrosopersulfide, which induces sustained effects due to the slow release of its decomposition products.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Nagy Péternek támogatásáért, nem csupán szakmai tanácsaiért és állandó segítségéért, amivel kutatómunkámat és szakmai előremenetelemet segítette.

Köszönöm az Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének és egyben programvezetőmnek, Prof. Dr. Sümegi Balázsnak a kutatómunkám során nyújtott támogatását és magas szintű szakmai tanácsait.

Köszönöm az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály összes munkatársának a barátságos, támogató légkört és szakmai segítségüket, különösen Dóka Évának és Ditrói Tamásnak, hogy mindig számíthattam szakmai és baráti támogatásukra. Köszönettel tartozom Lénárt Zsuzsanna és dr. Bognár Rita adminisztratív ügyekben nyújtott segítségéért, amellyel kutatómunkámat támogatták.

Köszönetemet szeretném kifejezni a PTE–ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében Prof. Dr. Pintér Erika intézetigazgatónak szakmai tanácsaiért, Dr. Sándor Zoltánnak a TRPV1 receptor expresszálo sejt vonal létrehozásáért és dr. Bártai István Zoárd hallgatótársamnak a kísérletek során nyújtott segítségéért.

Köszönöm külföldi kollégáimnak, Takaaki Akaike és Martin Feelisch professzoroknak, hogy lehetőséget biztosítottak kísérleteim elvégzésére saját kutatólaboratóriumukban, valamint Tomoaki Ida, Magda Minnion és Thomas Sutton segítségét, mellyel hozzájárultak kísérleteimhez.

Kutatómunkámhoz nyújtott anyagi támogatásáért köszönettel tartozom az Emberi Erőforrások Minisztériumának az Új Nemzeti Kiválóság Program Doktori Kutatói Ösztöndíjának keretében nyújtott támogatásáért (ÚNKP–16–3, ÚNKP–17–3), valamint az EFOP 3.6.1-16.2016.00004, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, OTKA K 109843, NKFIH KH 126766, és az NKFIH K 129286 pályázatoknak.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családom, párom és barátaim állandó támogatását és értékes, motiváló tanácsaikat.

## 9. Dokumentált publikációs tevékenység

### 9.1. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk

1. David E. Heppner, Milena Hristova, Tomoaki Ida, Ana Mijuskovic, Christopher M. Dustin, Virág Bogdándi, Jon M. Fukuto, Tobias P. Dick, Péter Nagy, Jianing Li, Takaaki Akaike, Albert van der Vliet

**Cysteine Perthiosulfenic Acid (Cys-SSOH): A Novel Intermediate in Thiol-Based Redox Signaling (társszerzős publikáció idegennyelvű tudományos folyóiratban)**

Redox Biology, 14, 379-385

*Megjelenés: 2018, IF: 7,126*

2. Virág Bogdándi, Péter Nagy

**Dojindo Products in Mechanistic Studies of Reactive Sulfur Species (elsőszerzős publikáció idegennyelvű folyóiratban)**

Dojin News, 2018, 164, 1–4

ISSN: 0385–1516

*Megjelenés: 2018*

3. Virág Bogdándi, Tomoaki Ida, Thomas R. Sutton, Christopher Bianco, Tamás Ditrói, Grielof Koster, Hillary Henthorn, Magda Minnion, John P. Toscano, Albert van der Vliet, Michael D. Pluth, Martin Feelisch, Jon M. Fukuto, Takaaki Akaike, Péter Nagy

**Polysulfide Speciation and Reaction with Alkylating Agents: Do we have any clue about what's inside the cell? (elsőszerzős publikáció idegennyelvű tudományos folyóiratban)**

British Journal of Pharmacology, DOI: 10.1111/bph.14394

*Megjelenés: 2018, IF: 6,810*

4. Christopher Bianco, Takaaki Akaike, Tomoaki Ida, Péter Nagy, Virág Bogdándi, John Toscano, Yoshito Kumagai, Catherine Henderson, Robert Goddu, Joseph Lin, Jon Fukuto

**The reaction of hydrogen sulfide with disulfides: formation of a stable trisulfide and implications for biological systems (társszerzős publikáció idegennyelvű tudományos folyóiratban)**

British Journal of Pharmacology, DOI: 10.1111/bph.14372

*Megjelenés: 2018, IF: 6,810*

5. Virág Bogdándi, István Zoárd Bártai, Magda Minnion, Zoltán Sándor, Erika Pintér, Martin Feelisch, Péter Nagy:

**Nitrosopersulfide (SSNO) is a potential protein Cys polysulfidating agent with sustained and long-range effects (konferencia absztrakt idegennyelvű tudományos folyóiratban)**

6. Virág Bogdándi, István Zoárd Bártai, Magda Minnion, Zoltán Sándor, Erika Pintér, Martin Feelisch, Péter Nagy:  
**Nitrosopersulfide (SSNO) is a potential protein Cys polysulfidating agent with sustained and long-range effects**  
*kézirat előkészítés alatt*

## 9.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó publikációk

1. Bogdándi Virág

**A tuberkulózis és kemoterápiája napjainkban (elsőszerzős publikáció magyar nyelvű tanulmánykötetben)**

A mi tendenciáink... Szakkollégiumi tanulmányok 2. c. tanulmánykötet, ISSN: 2063-6059

*Megjelenés: 2013*

2. Veres Péter, Ditrői Tamás, Bogdándi Virág, Búzás Eszter Bíborka, Bihari Zsolt  
**Hegyközkovácsi felszín alatti vizeinek hidrokémiai vizsgálata (társzerzős publikáció magyar nyelvű tanulmánykötetben)**

Bihari Hegyköz, 1. c. tanulmánykötet, ISBN: 978-963-473-632-5

*Megjelenés: 2013*

3. Laura Alcázar, Virág Bogdándi, Gábor Lente, Manuel Martínez, Marta Vázquez  
**Temperature- and Pressure-Dependent Kinetic-Mechanistic Studies on the Formation of Mixed-Valence {(Tetraamine)Co<sup>III</sup>NCFe<sup>II</sup>(CN)<sub>5</sub>}-units (társzerzős publikáció idegennyelvű tudományos folyóiratban)**

Journal of Coordination Chemistry, 68, 17–18, 3058–3068

*Megjelenés: 2015, IF: 1,756*

4. Virág Bogdándi, Gábor Lente, István Fábián

**Kinetics of the Oxidation of Isoniazid with Hypochlorite Ion (elsőszerzős publikáció idegennyelvű tudományos folyóiratban)**

Royal Society of Chemistry Advances, 5, 67500–67508

*Megjelenés: 2015, IF: 3,289*

**Összesített impakt faktorok száma: 25,791**

## 10. Konferencia előadások, posztterek listája

### 10.1. Az értekezéshez kapcsolódó konferencia előadások, posztterek listája

1. Marián Grman, Miriam M. Cortese-Krott, Virág Bogdándi, Martin Feelisch, Karol Ondriaš, Péter Nagy

**Polysulfides as Intermediate Species and Products of Nitrosopersulfide Synthesis and Decomposition (poszter)**

4th International Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide

2016. június 2-5, Nápoly, Olaszország

2. Bogdándi Virág, Nagy Péter, Miriam Cortese–Krott, Marian Grman, Martin Feelisch, Ming Xian

**Kénhidrogén által vezérelt jelátviteli folyamatok molekuláris mechanizmusai**

XIII. Pro Scientia Aranyérmesek Konferenciája

2016. november 17-19, Pécs

3. Virág Bogdándi, David E. Heppner, Milena Hristova, Tomoaki Ida, Ana Mijuskovic, Christopher M. Dustin, Jon M. Fukuto, Tobias P. Dick, Péter Nagy, Jianing Li, Takaaki Akaike, and Albert van der Vliet

**Cysteine Perthiosulfenic Acid (Cys-SSOH): A Novel Intermediate in Thiol-Based Redox Signaling**

S–BIO 2017 Plant and Human Sulfur Biology Conference 2017

2017. szeptember 10–14, Balatonfüred

4. Bogdándi Virág, Bátai István Zoárd, Sándor Zoltán, Sághy Éva, Pintér Erika, Nagy Péter

**A kénhidrogén redox jelátviteli folyamatokban betöltött szerepének biológiai vizsgálata**

Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban

2017. október 28., Pécs

5. Bogdándi Virág, David E. Heppner, Milena Hristova, Tomoaki Ida, Ana Mijuskovic, Christopher M. Dustin, Jon M. Fukuto, Tobias P. Dick, Péter Nagy, Jianing Li, Takaaki Akaike, and Albert van der Vliet

**Ciszteín–pertioszulfénsav (Cys-SSOH): A tiolfehérjéket érintő redox jelátvitel egy újabban azonosított köztiterméke**

A Magyar Tudományos Akadémia Reakciókinetikai és Fotokémiai

Munkabizottságának Ülése

2017. november 2–3., Budapest

6. Virág Bogdándi, István Zoárd Bártai, Magda Minnion, Zoltán Sándor, Erika Pintér, Martin Feelisch and Péter Nagy

**Nitrosopersulfide (SSNO—) is a potential protein Cys polysulfidating agent with sustained and long range effects**

7th Interdisciplinary Doctoral Conference

2018. május 17–19., Pécs

7. Bogdándi Virág, David E. Heppner, Milena Hristova, Tomoaki Ida, Ana Mijuskovic, Christopher M. Dustin, Jon M. Fukuto, Tobias P. Dick, Péter Nagy, Jianing Li, Takaaki Akaike, and Albert van der Vliet

**Cysteine Perthiolsulfenic Acid (Cys-SSOH): A Novel Intermediate in Thiol-Based Redox Signaling (poszter)**

7th Interdisciplinary Doctoral Conference

2018. május 17–19., Pécs

8. Bogdándi Virág

**Nitrozoperszulfid biológiai hatásának vizsgálata TRPA1 receptorok aktivációjának tanulmányozásával**

Intézményi ÚNKP Konferencia

2018. május 24., Pécs

9. Bogdándi Virág, Nagy Péter

**Reaktív kénszármazékok alkilálási reakciói – avagy mit detektálunk sejten belül?**

A Magyar Tudományos Akadémia Reakciókinetikai és Fotokémiai

Munkabizottságának Ülése

2018. május 25., Balatonalmádi

10. Virág Bogdándi, István Zoárd Bártai, Magda Minnion, Zoltán Sándor, Erika Pintér, Martin Feelisch and Péter Nagy

**Nitrosopersulfide (SSNO—) is a potential protein Cys polysulfidating agent with sustained and long range effects (poszter)**

19th SFRRI Biennial Meeting

2018. június 4–7., Lisszabon (Portugália)

11. Virág Bogdándi, Tomoaki Ida, Thomas R Sutton, Christopher Bianco, Tamás Ditrói, Grielof Koster, Hillary A Henthorn, Magda Minnion, JohnPToscano, Albert van der Vliet, Michael D Pluth, Martin Feelisch, Jon M Fukuto, Takaaki Akaike, Péter Nagy

**Speciation of Reactive Sulfur Species and their reactions with alkylating agents: Do we have any clue about what is present in the cell?**

King's College London Redox Biology & Medicine Symposium

2018. szeptember 21., London (Egyesült Királyság)



12. Virág Bogdándi, Tomoaki Ida, Thomas R Sutton, Christopher Bianco, Tamás Ditrói, Grielof Koster, Hillary A Henthorn, Magda Minnion, JohnPToscano, Albert van der Vliet, Michael D Pluth, Martin Feelisch, Jon M Fukuto, Takaaki Akaike, Péter Nagy  
**Speciation of Reactive Sulfur Species and their reactions with alkylating agents: Do we have any clue about what is present in the cell?**

Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences

2018. október 27., Pécs

13. Virág Bogdándi, István Zoárd Bártai, Magda Minnion, Zoltán Sándor, Erika Pintér, Martin Feelisch and Péter Nagy

**Nitrosopersulfide (SSNO—) is a potential protein Cys polysulfidating agent with sustained and long range effects (poszter)**

Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences

2018. október 27., Pécs

14. Bogdándi Virág, Bártai István Zoárd, Magda Minnion, Sándor Zoltán, Pintér Erika, Martin Feelisch, Nagy Péter

**Nitrozoperszulfid: egy újabban azonosított szulfán kén donor molekula, elnyújtott és széleskörű fehérje per- és poliszulfidációs hatással**

Az MTA Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottság, a Koordinációs Kémiai Munkabizottság és a VEAB Kémiai Szakbizottság közös Tudományos Ülése

2018. november 9., Veszprém

## 10.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó konferencia előadások, poszterek listája

1. Bogdándi Virág

### **Izoniazid reakciója permanganáttal**

Hatvani István Szakkollégium 2012. évi Tavaszi Hallgatói Konferenciája

2012. május 3., Debrecen

2. Bogdándi Virág

### **Izoniazid reakciója permanganáttal**

A Természettudományi és Technológiai Kar DETEP Programjában résztvevő Új Hallgatók Fóruma

2012. május 10., Debrecen

3. Bogdándi Virág

### **TBC antibiotikumok lebontása**

Kutatók Éjszakája 2012

2012. szeptember 28., Debrecen

4. Bogdándi Virág, Lente Gábor, Fábíán István

### **Az izoniazid és a permanganátion közötti reakció**

A Magyar Tudományos Akadémia Reakciókinetikai és Fotokémiai

Munkabizottságának Ülése

2012. október 26., Gyöngyöstarján

5. Bogdándi Virág

### **Az izoniazid és a permanganátion közötti reakció**

DE-TTK Kari Tudományos Diákköri Konferencia, Kémia Szekció, Fizikai Kémiai Tagozat

2012. november 22., Debrecen

6. Bogdándi Virág

### **Az izoniazid és a permanganátion közötti reakció**

Hatvani István Szakkollégium 2012. évi Őszi Hallgatói Konferenciája

2012. december 7., Debrecen

7. Bogdándi Virág

### **Izoniazid oxidációja permanganáttal**

Jánossy Ferenc Emlékkonferencia 2013

2013. március 9., Budapest

8. Bogdándi Virág

### **A XXI. század visszatérő népbetegsége, a tuberkulózis**

2. See Science Festival

2013. március 22., Debrecen

9. Bogdándi Virág, Lente Gábor, Fábíán István  
**Az izoniazid és a permanganácion közötti reakció kinetikája (poszter)**  
XVIII. Bolyai Konferencia  
*2013. március 23-24., Budapest*
10. Bogdándi Virág  
**Az izoniazid és a permanganácion közötti reakció**  
XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Kémia és Vegyipari Szekció  
*2013. április 4-6., Eger*
11. Bogdándi Virág  
**A XXI. század visszatérő népbetegsége, a tuberkulózis**  
Hatvani István Szakkollégium 2013. évi Tavaszi Hallgatói Konferenciája  
*2013. május 2-3., Debrecen*
12. Bogdándi Virág  
**Izoniazid oxidációja permanganácionnal**  
XIV. Eötvös Konferencia  
*2013. május 3-5., Budapest*
13. Virág Bogdándi, Gábor Lente, István Fábíán  
**Kinetics of the oxidation of isoniazid with permanganate ion (poszter)**  
Debrecen Colloquium on Inorganic Reaction Mechanisms  
*2013. június 11-15., Debrecen*
14. Virág Bogdándi, Gábor Lente, István Fábíán  
**Kinetics of the oxidation of isoniazid with permanganate ion (poszter)**  
8th International Conference on Chemical Kinetics  
*2013. július 8-12., Sevilla, Spanyolország*
15. Bogdándi Virág  
**A XXI. század visszatérő népbetegsége, a tuberkulózis**  
Kutatók Éjszakája 2013  
*2013. szeptember 27., Debrecen*
16. Bogdándi Virág  
**Izoniazid oxidációja permanganácionnal**  
Természettudományi Diákköri Műhelyek Konferencia  
*2013. szeptember 30., Debrecen*
17. Bogdándi Virág  
**Izoniazid oxidációja permanganácionnal**  
XXXVI. Kémiai Előadói Napok  
*2013. október 28-30., Szeged*

18. Bogdándi Virág

**A Cu(II)-Pytren-4-phen komplex képződésének és bomlásának kinetikája és mechanizmusa**

Hatvani István Szakkollégium 2013. évi Őszi Hallgatói Konferenciája  
2013. november 16-17., Debrecen

19. Bogdándi Virág, Laura M. Acosta, Manuel G. Bassallote

**A Cu(II)-Pytren-4-phen komplex képződése és bomlása (poszter)**

XIX. Bolyai Konferencia  
2014. március 22-23., Budapest

20. Bogdándi Virág, Lente Gábor, Fábán István

**Az izoniazid és a permanganácion közötti reakció kinetikája (poszter)**

XI. Jedlik Ányos Szakmai Napok  
2014. április 10-12., Veszprém

21. Bogdándi Virág

**Az izoniazid és a permanganácion közötti reakció**

DETEP Konferencia  
2014. április 25., Debrecen

22. Virág Bogdándi, Gábor Lente, István Fábán

**Oxidation of isoniazid with hypochlorite ion (poszter)**

European Colloquium on Inorganic Reaction Mechanisms  
2014. június 17-20., Debrecen

23. Bogdándi Virág

**Izoniazid reakciója szervesetlen oxidálószerekkel**

DE-TTK Kari Tudományos Diákköri Konferencia, Kémia Szekció, Fizikai Kémiai Tagozat  
2014. november 28., Debrecen

24. Bogdándi Virág

**Izoniazid reakciója szervesetlen oxidálószerekkel**

Hatvani István Szakkollégium 2014. évi Őszi Hallgatói Konferenciája  
2014. december 5., Debrecen

25. Veres Péter, Ditrói Tamás, Bogdándi Virág, Búzás Eszter Bíborka, Bihari Zsolt

**Hegyközkovácsi felszín alatti vizei hidrokémiai vizsgálatának módszerei és eredményei (társszerzős előadás)**

Bihari Hegyköz 1. c. tanulmánykötet határon túli bemutatója  
2014. december 6., Hegyközkovácsi (Cauaceu), Románia

26. Bogdándi Virág

**Izoniazid reakciója szervesetlen oxidálószerekkel**

XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Kémia és Vegyipari Szekció  
2015. április 9-11., Veszprém

**27. Bogdándi Virág**

**Izoniazid reakciója permanganáttal és hipoklorittal**

DETEP Konferencia

*2015. április 24., Debrecen*

**28. Bogdándi Virág, Lente Gábor, Fábíán István**

**Izoniazid reakciója szerves oxidálószerrel (poszter)**

XX. Bolyai Konferencia

*2015. május 2-3., Budapest*

**29. Bogdándi Virág**

**Izoniazid reakciója permanganáttal és hipoklorittal**

Hatvani István Szakkollégium 2015. évi Tavasz Hallgatói Konferenciája

*2015. május 7-8., Debrecen*

## 11. Hivatkozások

1. L. R. Goodwin, D. Francom, F. P. Dieken, J. D. Taylor, M. W. Warenycia, R. J. Reiffenstein et al., *Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports*. J Anal Toxicol (1989) 13, 105-109.
2. M. W. Warenycia, L. R. Goodwin, C. G. Benishin, R. J. Reiffenstein, D. M. Francom, J. D. Taylor et al., *Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels*. Biochem Pharmacol (1989) 38, 973-981.
3. R. Wang, *Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed*. Physiol Rev (2012) 92, 791-896.
4. C. Szabo, *A timeline of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) research: From environmental toxin to biological mediator*. Biochem Pharmacol (2018) 149, 5-19.
5. V. Bogdandi, T. Ida, T. R. Sutton, C. Bianco, T. Ditroi, G. Koster et al., *Speciation of reactive sulfur species and their reactions with alkylating agents: do we have any clue about what is present inside the cell?* Br J Pharmacol (2019) 176, 646-670.
6. M. M. Cortese-Krott, G. G. Kuhnle, A. Dyson, B. O. Fernandez, M. Grman, J. F. DuMond et al., *Key bioactive reaction products of the NO/H<sub>2</sub>S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl*. Proc Natl Acad Sci U S A (2015) 112, E4651-4660.
7. E. Doka, I. Pader, A. Biro, K. Johansson, Q. Cheng, K. Ballago et al., *A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems*. Sci Adv (2016) 2, e1500968.
8. R. Miyamoto, S. Koike, Y. Takano, N. Shibuya, Y. Kimura, K. Hanaoka et al., *Polysulfides (H<sub>2</sub>Sn) produced from the interaction of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and nitric oxide (NO) activate TRPA1 channels*. Sci Rep (2017) 7, 45995.
9. P. Nagy, *Mechanistic chemical perspective of hydrogen sulfide signaling*. Methods Enzymol (2015) 554, 3-29.
10. O. Kabil, R. Banerjee, *Enzymology of H<sub>2</sub>S biogenesis, decay and signaling*. Antioxid Redox Signal (2014) 20, 770-782.

11. N. Nagahara, *Regulation of mercaptopyruvate sulfurtransferase activity via intrasubunit and intersubunit redox-sensing switches*. *Antioxid Redox Signal* (2013) 19, 1792-1802.
12. T. Chiku, D. Padovani, W. Zhu, S. Singh, V. Vitvitsky, R. Banerjee, *H<sub>2</sub>S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia*. *J Biol Chem* (2009) 284, 11601-11612.
13. P. K. Yadav, K. Yamada, T. Chiku, M. Koutmos, R. Banerjee, *Structure and kinetic analysis of H<sub>2</sub>S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase*. *J Biol Chem* (2013) 288, 20002-20013.
14. T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai et al., *Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling*. *P Natl Acad Sci USA* (2014) 111, 7606-7611.
15. T. Yamanishi, S. Tuboi, *The mechanism of the L-cystine cleavage reaction catalyzed by rat liver gamma-cystathionase*. *J Biochem* (1981) 89, 1913-1921.
16. P. K. Yadav, M. Martinov, V. Vitvitsky, J. Seravalli, R. Wedmann, M. R. Filipovic et al., *Biosynthesis and Reactivity of Cysteine Persulfides in Signaling*. *J Am Chem Soc* (2016) 138, 289-299.
17. C. Szabo, C. Ransy, K. Modis, M. Andriamihaja, B. Murghes, C. Coletta et al., *Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms*. *Br J Pharmacol* (2014) 171, 2099-2122.
18. T. M. Hildebrandt, M. K. Grieshaber, *Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria*. *FEBS J* (2008) 275, 3352-3361.
19. U. Theissen, M. Hoffmeister, M. Grieshaber, W. Martin, *Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide:quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times*. *Mol Biol Evol* (2003) 20, 1564-1574.
20. M. M. Cherney, Y. Zhang, M. Solomonson, J. H. Weiner, M. N. James, *Crystal structure of sulfide:quinone oxidoreductase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*: insights into sulfidotrophic respiration and detoxification*. *J Mol Biol* (2010) 398, 292-305.

21. M. Gubern, M. Andriamihaja, T. Nubel, F. Blachier, F. Bouillaud, *Sulfide, the first inorganic substrate for human cells*. FASEB J (2007) 21, 1699-1706.
22. N. Helmy, C. Prip-Buus, C. Vons, V. Lenoir, A. Abou-Hamdan, H. Guedouari-Bounihi et al., *Oxidation of hydrogen sulfide by human liver mitochondria*. Nitric Oxide (2014) 41, 105-112.
23. E. Lagoutte, S. Mimoun, M. Andriamihaja, C. Chaumontet, F. Blachier, F. Bouillaud, *Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes*. Biochim Biophys Acta (2010) 1797, 1500-1511.
24. P. Nagy, Z. Palinkas, A. Nagy, B. Budai, I. Toth, A. Vasas, *Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples*. Biochim Biophys Acta (2014) 1840, 876-891.
25. R. Pietri, A. Lewis, R. G. Leon, G. Casabona, L. Kiger, S. R. Yeh et al., *Factors controlling the reactivity of hydrogen sulfide with hemoproteins*. Biochemistry (2009) 48, 4881-4894.
26. R. Pietri, E. Roman-Morales, J. Lopez-Garriga, *Hydrogen sulfide and hemoproteins: knowledge and mysteries*. Antioxid Redox Signal (2011) 15, 393-404.
27. B. B. Rios-Gonzalez, E. M. Roman-Morales, R. Pietri, J. Lopez-Garriga, *Hydrogen sulfide activation in hemoproteins: the sulfheme scenario*. J Inorg Biochem (2014) 133, 78-86.
28. J. P. Collman, S. Ghosh, A. Dey, R. A. Decreau, *Using a functional enzyme model to understand the chemistry behind hydrogen sulfide induced hibernation*. Proc Natl Acad Sci U S A (2009) 106, 22090-22095.
29. Z. Palinkas, P. G. Furtmuller, A. Nagy, C. Jakopitsch, K. F. Pirker, M. Magierowski et al., *Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase*. Br J Pharmacol (2015) 172, 1516-1532.
30. R. Wedmann, S. Bertlein, I. Macinkovic, S. Boltz, J. Miljkovic, L. E. Munoz et al., *Working with "H<sub>2</sub>S": Facts and apparent artifacts*. Nitric Oxide (2014) 41, 85-96.
31. R. Greiner, Z. Palinkas, K. Basell, D. Becher, H. Antelmann, P. Nagy et al., *Polysulfides link H<sub>2</sub>S to protein thiol oxidation*. Antioxid Redox Signal (2013) 19, 1749-1765.
32. H. Kimura, *Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system*. Neurochem Int (2013) 63, 492-497.
33. H. Kimura, *Signaling molecules: hydrogen sulfide and polysulfide*. Antioxid Redox Signal (2015) 22, 362-376.



34. Y. Kimura, H. Kimura, *Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress*. FASEB J (2004) 18, 1165-1167.
35. S. Koike, Y. Ogasawara, N. Shibuya, H. Kimura, K. Ishii, *Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by t-butylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells*. FEBS Lett (2013) 587, 3548-3555.
36. R. W. Nielsen, C. Tachibana, N. E. Hansen, J. R. Winther, *Trisulfides in proteins*. Antioxid Redox Signal (2011) 15, 67-75.
37. K. Ono, T. Akaike, T. Sawa, Y. Kumagai, D. A. Wink, D. J. Tantillo et al., *Redox chemistry and chemical biology of H<sub>2</sub>S, hydropersulfides, and derived species: implications of their possible biological activity and utility*. Free Radic Biol Med (2014) 77, 82-94.
38. J. I. Toohey, *Sulphane sulphur in biological systems: a possible regulatory role*. Biochem J (1989) 264, 625-632.
39. J. I. Toohey, *Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane?* Anal Biochem (2011) 413, 1-7.
40. M. R. Hoffmann, *Kinetics and Mechanism of Oxidation of Hydrogen-Sulfide by Hydrogen-Peroxide in Acidic Solution*. Environ Sci Technol (1977) 11, 61-66.
41. A. K. Mustafa, M. M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. Mu, S. K. Gazi et al., *H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulphydration*. Sci Signal (2009) 2, ra72.
42. A. K. Mustafa, G. Sikka, S. K. Gazi, J. Steppan, S. M. Jung, A. K. Bhunia et al., *Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulphydrates potassium channels*. Circ Res (2011) 109, 1259-1268.
43. N. Krishnan, C. Fu, D. J. Pappin, N. K. Tonks, *H<sub>2</sub>S-Induced sulphydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response*. Sci Signal (2011) 4, ra86.
44. G. Yang, K. Zhao, Y. Ju, S. Mani, Q. Cao, S. Puukila et al., *Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulphydration of Keap1 and activation of Nrf2*. Antioxid Redox Signal (2013) 18, 1906-1919.
45. P. Nagy, C. C. Winterbourn, in *Advances in Molecular Toxicology*. (2010), vol. 4, pp. 183-222.
46. J. I. Toohey, *The conversion of H<sub>2</sub>S to sulfane sulfur*. Nat Rev Mol Cell Biol (2012) 13, 803; author reply p 803.

47. V. Gupta, K. S. Carroll, *Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime*. *Biochim Biophys Acta* (2014) 1840, 847-875.
48. L. B. Poole, P. A. Karplus, A. Claiborne, *Protein sulfenic acids in redox signaling*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2004) 44, 325-347.
49. P. Nagy, M. T. Ashby, *Reactive sulfur species: kinetics and mechanisms of the oxidation of cysteine by hypohalous acid to give cysteine sulfenic acid*. *J Am Chem Soc* (2007) 129, 14082-14091.
50. P. Nagy, K. Lemma, M. T. Ashby, *Reactive sulfur species: kinetics and mechanisms of the reaction of cysteine thiosulfinate ester with cysteine to give cysteine sulfenic acid*. *J Org Chem* (2007) 72, 8838-8846.
51. D. Cavallini, G. Federici, E. Barboni, *Interaction of proteins with sulfide*. *Eur J Biochem* (1970) 14, 169-174.
52. N. E. Francoleon, S. J. Carrington, J. M. Fukuto, *The reaction of H<sub>2</sub>S with oxidized thiols: Generation of persulfides and implications to H<sub>2</sub>S biology*. *Arch Biochem Biophys* (2011) 516, 146-153.
53. A. Vasas, E. Doka, I. Fabian, P. Nagy, *Kinetic and thermodynamic studies on the disulfide-bond reducing potential of hydrogen sulfide*. *Nitric Oxide* (2015) 46, 93-101.
54. P. Nagy, *Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways*. *Antioxid Redox Signal* (2013) 18, 1623-1641.
55. T. N. Das, R. E. Huie, P. Neta, S. Padmaja, *Reduction potential of the sulfhydryl radical: Pulse radiolysis and laser flash photolysis studies of the formation and reactions of center dot SH and HSSH center dot(-) in aqueous solutions*. *J Phys Chem A* (1999) 103, 5221-5226.
56. T. Akaike, T. Ida, F. Y. Wei, M. Nishida, Y. Kumagai, M. M. Alam et al., *Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics*. *Nat Commun* (2017) 8, 1177.
57. J. M. Fukuto, L. J. Ignarro, P. Nagy, D. A. Wink, C. G. Kevil, M. Feelisch et al., *Biological hydropersulfides and related polysulfides - a new concept and perspective in redox biology*. *FEBS Lett* (2018) 592, 2140-2152.
58. B. D. Paul, S. H. Snyder, *H<sub>2</sub>S signalling through protein sulfhydration and beyond*. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2012) 13, 499-507.

59. D. Zhang, I. Macinkovic, N. O. Devarie-Baez, J. Pan, C. M. Park, K. S. Carroll et al., *Detection of protein S-sulphydration by a tag-switch technique*. *Angew Chem Int Ed Engl* (2014) 53, 575-581.
60. E. Doka, E. S. J. Arner, E. E. Schmidt, P. Nagy, in *Methods Mol Biol*, J. Beltowski, Ed. (Springer, in press, 2017), vol. Special Issue.
61. X.-H. Gao, D. Krokowski, B.-J. Guan, I. Bederman, M. Majumder, M. Parisien et al., *Quantitative H<sub>2</sub>S-mediated protein sulphydration reveals metabolic reprogramming during the integrated stress response*. *eLife* (2015) 4, e10067.
62. S. Longen, F. Richter, Y. Köhler, I. Wittig, K.-F. Beck, J. Pfeilschifter, *Quantitative Persulfide Site Identification (qPerS-SID) Reveals Protein Targets of H<sub>2</sub>S Releasing Donors in Mammalian Cells*. *Sci Rep* (2016) 6, 29808-29808.
63. J. I. Seeman, *The Curtin-Hammett principle and the Winstein-Holness equation: new definition and recent extensions to classical concepts*. *J Chem Educ* (1986) 63, 42.
64. V. Kumar, T. Kleffmann, M. B. Hampton, M. B. Cannell, C. C. Winterbourn, *Redox proteomics of thiol proteins in mouse heart during ischemia/reperfusion using ICAT reagents and mass spectrometry*. *Free Radic Biol Med* (2013) 58, 109-117.
65. M. C. Sobotta, A. G. Barata, U. Schmidt, S. Mueller, G. Millonig, T. P. Dick, *Exposing cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: A quantitative comparison between continuous low-dose and one-time high-dose treatments*. *Free Radic Biol Med* (2013) 60, 325-335.
66. C. Kevil, M. M. Cortese-Krott, P. Nagy, A. Papapetropoulos, M. Feelisch, C. Szabo, in *Nitric Oxide (Third Edition)*, L. J. Ignarro, B. A. Freeman, Eds. (Academic Press, 2017), pp. 57-83.
67. R. Hosoki, N. Matsuki, H. Kimura, *The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide*. *Biochem Biophys Res Commun* (1997) 237, 527-531.
68. R. Wang, *Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulfide*. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2011) 20, 107-112.
69. M. Y. Ali, C. Y. Ping, Y. Y. Mok, L. Ling, M. Whiteman, M. Bhatia et al., *Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide?* *Br J Pharmacol* (2006) 149, 625-634.
70. M. Whiteman, L. Li, I. Kostetski, S. H. Chu, J. L. Siau, M. Bhatia et al., *Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide*. *Biochem Biophys Res Commun* (2006) 343, 303-310.

71. M. R. Filipovic, J. Miljkovic, T. Nauser, M. Royzen, K. Klos, T. Shubina et al., *Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H<sub>2</sub>S and S-nitrosothiols*. J Am Chem Soc (2012) 134, 12016-12027.
72. J. P. Marcolongo, U. N. Morzan, A. Zeida, D. A. Scherlis, J. A. Olabe, *Nitrosodisulfide [S<sub>2</sub>NO](-) (perthionitrite) is a true intermediate during the "cross-talk" of nitrosyl and sulfide*. Phys Chem Chem Phys (2016) 18, 30047-30052.
73. J. P. Marcolongo, A. Zeida, L. D. Slep, J. A. Olabe, *Thionitrous Acid/Thionitrite and Perthionitrite Intermediates in the "Crosstalk" of NO and H<sub>2</sub>S*. Adv Inorg Chem (2017) 70, 277-309.
74. A. P. Munro, D. L. H. Williams, *Reactivity of sulfur nucleophiles towards S-nitrosothiols*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 (2000), 1794-1797.
75. D. L. H. WILLIAMS, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide*. (Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 2004), pp. 280.
76. D. C. Gesellschaft, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. (Verlag Chemie., 1942).
77. M. Goehring, H. Herb, W. Koch, *über Das Heptaschwefelimid, S<sub>7</sub>NH*. Z Anorg Allg Chem (1951) 264, 137-143.
78. M. RP, N. M, H. JR, *Spectroscopic investigation of HSNO in a low temperature matrix. UV, VIS, and IR-induced isomerisations*. Chem Phys (1984) 87, 351-361.
79. C.-H. Lai, E. Y. Li, P.-T. Chou, *Isomerization reactions of RSNO (R=H, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>n ≤ 4)*. Theor Chem Acc (2007) 117, 145-152.
80. Q. K. Timerghazin, A. M. English, G. H. Peslherbe, *On the multireference character of S-nitrosothiols: A theoretical study of HSNO*. Chem Phys Lett (2008) 454, 24-29.
81. Q. K. Timerghazin, G. H. Peslherbe, A. M. English, *Structure and stability of HSNO, the simplest S-nitrosothiol*. Phys Chem Chem Phys (2008) 10, 1532-1539.
82. M. M. Cortese-Krott, B. O. Fernandez, M. Kelm, A. R. Butler, M. Feelisch, *On the chemical biology of the nitrite/sulfide interaction*. Nitric Oxide-Biol Ch (2015) 46, 14-24.
83. M. M. Cortese-Krott, B. O. Fernandez, J. L. Santos, E. Mergia, M. Grman, P. Nagy et al., *Nitrosopersulfide (SSNO(-)) accounts for sustained NO bioactivity of S-nitrosothiols following reaction with sulfide*. Redox Biol (2014) 2, 234-244.

84. A. Berenyiova, M. Grman, A. Mijuskovic, A. Stasko, A. Misak, P. Nagy et al., *The reaction products of sulfide and S-nitrosoglutathione are potent vasorelaxants*. Nitric Oxide (2015) 46, 123-130.
85. M. M. Cortese-Krott, A. R. Butler, J. D. Woollins, M. Feelisch, *Inorganic sulfur-nitrogen compounds: from gunpowder chemistry to the forefront of biological signaling*. Dalton Trans (2016) 45, 5908-5919.
86. M. M. Cortese-Krott, D. Pullmann, M. Feelisch, *Nitrosopersulfide (SSNO(-)) targets the Keap-1/Nrf2 redox system*. Pharmacol Res (2016) 113, 490-499.
87. R. Wedmann, I. Ivanovic-Burmazovic, M. R. Filipovic, *Nitrosopersulfide (SSNO(-)) decomposes in the presence of sulfide, cyanide or glutathione to give HSNO/SNO(-): consequences for the assumed role in cell signalling*. Interface Focus (2017) 7, 20160139.
88. F. Seel, R. Kuhn, G. Simon, M. Wagner, B. Krebs, M. Dartmann, *Pnp-Perthionitrite and Pnp-Monothionitrite*. Z Naturforsch B (1985) 40, 1607-1617.
89. F. Seel, G. Simon, J. Schuh, M. Wagner, B. Wolf, I. Ruppert et al., *Investigation of the Reaction of Sulfur with Sodium-Nitrite in Dmf, DmsO, and Hmpa*. Z Anorg Allg Chem (1986) 538, 177-190.
90. F. Seel, M. Wagner, *Reaction of Sulfides with Nitrogen Monoxide in Aqueous-Solution*. Z Anorg Allg Chem (1988) 558, 189-192.
91. E. Victor, *Reactions of S-nitrosothiols with biomimetic iron complexes and other transition metals*. Massachusetts Institute of Technology, PhD Thesis (2014).
92. B. F. Bessac, S. E. Jordt, *Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control*. Physiology (Bethesda) (2008) 23, 360-370.
93. D. Julius, *TRP channels and pain*. Annu Rev Cell Dev Biol (2013) 29, 355-384.
94. S. Akerman, D. J. Williamson, P. J. Goadsby, *Voltage-dependent calcium channels are involved in neurogenic dural vasodilatation via a presynaptic transmitter release mechanism*. Br J Pharmacol (2003) 140, 558-566.
95. S. Zurborg, B. Yurgionas, J. A. Jira, O. Caspani, P. A. Heppenstall, *Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca<sup>2+</sup>*. Nat Neurosci (2007) 10, 277-279.
96. M. Eberhardt, M. Dux, B. Namer, J. Miljkovic, N. Cordasic, C. Will et al., *H<sub>2</sub>S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway*. Nat Commun (2014) 5, 4381.

97. J. M. Fukuto, S. J. Carrington, *HNO signaling mechanisms*. *Antioxid Redox Signal* (2011) 14, 1649-1657.
98. J. M. Fukuto, C. H. Switzer, K. M. Miranda, D. A. Wink, *Nitroxyl (HNO): chemistry, biochemistry, and pharmacology*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2005) 45, 335-355.
99. K. Bolcskei, Z. Helyes, A. Szabo, K. Sandor, K. Elekes, J. Nemeth et al., *Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice*. *Pain* (2005) 117, 368-376.
100. D. Garai, B. B. Rios-Gonzalez, P. G. Furtmuller, J. M. Fukuto, M. Xian, J. Lopez-Garriga et al., *Mechanisms of myeloperoxidase catalyzed oxidation of H<sub>2</sub>S by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or O<sub>2</sub> to produce potent protein Cys-polysulfide-inducing species*. *Free Radic Biol Med* (2017) 113, 551-563.
101. P. Nagy, C. C. Winterbourn, *Rapid reaction of hydrogen sulfide with the neutrophil oxidant hypochlorous acid to generate polysulfides*. *Chem Res Toxicol* (2010) 23, 1541-1543.
102. D. E. Heppner, M. Hristova, T. Ida, A. Mijuskovic, C. M. Dustin, V. Bogdandi et al., *Cysteine perthiosulfenic acid (Cys-SSOH): A novel intermediate in thiol-based redox signaling?* *Redox Biol* (2018) 14, 379-385.
103. C. W. Scheele, *Chemische Abhandlung von der Luft und der Feuer, Upsala und Leipzig*. (1777), 153.
104. J. Berzelius, *De la Composition des Sulfures Alcalins*. *Ann Chim Phys* (1822) 20, 113-141.
105. A. Kamyshny, Jr., A. Goifman, J. Gun, D. Rizkov, O. Lev, *Equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solutions at 25 degrees C: a new approach for the study of polysulfides' equilibria*. *Environ Sci Technol* (2004) 38, 6633-6644.
106. M. Jung, S. Kasamatsu, T. Matsunaga, S. Akashi, K. Ono, A. Nishimura et al., *Protein polysulfidation-dependent persulfide dioxygenase activity of ethylmalonic encephalopathy protein 1*. *Biochem Biophys Res Commun* (2016) 480, 180-186.
107. C. E. Paulsen, K. S. Carroll, *Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery*. *Chem Rev* (2013) 113, 4633-4679.
108. A. N. Kuntz, E. Davioud-Charvet, A. A. Sayed, L. L. Califf, J. Dessolin, E. S. Arner et al., *Thioredoxin glutathione reductase from Schistosoma mansoni: an essential parasite enzyme and a key drug target*. *PLoS Med* (2007) 4, e206.

109. C. G. Miller, A. Holmgren, E. S. J. Arner, E. E. Schmidt, *NADPH-dependent and -independent disulfide reductase systems*. Free Radic Biol Med (2018) 127, 248-261.
110. I. Pader, R. Sengupta, M. Cebula, J. Xu, J. O. Lundberg, A. Holmgren et al., *Thioredoxin-related protein of 14 kDa is an efficient L-cystine reductase and S-denitrosylase*. Proc Natl Acad Sci U S A (2014) 111, 6964-6969.