

**Cisztein származékok polisulfidációjának
biológiailag releváns mechanizmusai**

Bogdándi Virág

Doktori (PhD) értekezés tézisei



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

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Országos Onkológiai Intézet

2019

1. Bevezetés

Doktori kutatómunkám során a kénhidrogén (hidrogén–szulfid) által vezérelt jelátviteli folyamatok molekuláris mechanizmusait tanulmányoztam. A kénhidrogén hosszú éveken keresztül csupán toxicitásáról volt ismert, ugyanis nagy koncentrációban a *citokróm-c-oxidáz* enzim inhibícióján keresztül a mitokondriális sejtlégzés gátlásához vezet. Később azonban több kutatás eredménye is arra vezetett, hogy a kénhidrogén az élő szervezetben enzimatikus és nem enzimatikus útvonalakon is termelődik, kisebb koncentrációkban pedig több biokémiai útvonalat is szabályoz. Mára már számos fiziológiás és patofiziológiás folyamatban igazolták kulcsfontosságú szerepét többek között a sejten belüli jelátviteli útvonalak szabályozásán keresztül, melynek eredményeként a kénhidrogént is kis jelátviteli molekulaként tartják számon.

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, valamint azt, hogy három, széles körben alkalmazott alkilálószer elektrofilicitása, koncentrációja, illetve az inkubálási idő hogyan befolyásolja a detektált módosulatok eloszlását a reaktív kénszármazékok közötti dinamikus redox egyensúlyi reakciók eltolása, valamint a poliszulfid láncok hasítása révén.

Poliszulfidok mint jelátviteli molekulák a szulfid és a nitrogén–monoxid által vezérelt jelátvitel összefonódása során is keletkezhetnek egy hibrid jelátviteli köztitermék, a nitrozoperszulfid ($SSNO^-$) képződése mellett, illetve bomlástermékeiként. Kutatómunkám során kísérleteket folytattam a nitrozoperszulfid kémiai karakterizálására, tanulmányoztam bomlási reakcióit, majd több modellrendszeren is vizsgáltam biológiai hatását.

Kinetikai kísérleteim arra engednek következtetni, hogy a nitrozoperszulfid lassú bomlása során poliszulfid donorként funkcionálhat. A sejten belüli redukáló rendszereket kikerülve per- és poliszulfidációs reakciók indukálása által közvetítőként vehet részt egyes jelátviteli útvonalakban, melyet több biológiailag is releváns modellen (redukált glutation, humán szérum albumin, HEK293 sejtek) is igazoltam. Az említett modellrendszerek mellett, sejttes rendszerekben *transziens receptor potenciál ankyrin 1*

(TRPA1) receptorokon is sikerült megmutatnunk a nitrozoperszulfid által kibocsátott szervesetlen poliszulfidok hatására lejátszódó elnyújtott aktivációt.

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. Célkitűzések

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., Célom volt elemezni a jelenleg széles körben alkalmazott detektálási eljárásokban közös alkilálási protokollokat és egy átfogó tanulmányban megvizsgálni azok előnyeit valamint hátrányait, rávilágítva 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.

3., A kutatómunka további részében a kénhidrogén és a nitrogén–monoxid által vezérelt jelátviteli utak összefonódására fókuszáltam a két részecske kémiai kölcsönhatásai során keletkező köztitermék, a nitrozoperszulfid ($SSNO^-$) hatásainak tanulmányozása által. Célom 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.

3. Anyag és módszer

3.1. 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 előállítása és pontos koncentrációjuknak meghatározása a szakirodalomban ismertetett módon történt. 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 (K_2S_x ; különböző lánc hosszúságú poliszulfidok keveréke), nátrium diszulfid (Na_2S_2), nátrium triszulfid (Na_2S_3) vagy nátrium tetraszulfid (Na_2S_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.

3.2. Módszerek

3.2.1. 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 (ϵ)

ismeretében számítottuk ki a pontos értékeket. Referenciaoldatként háromszorosan ultraszűrt vizet, vagy a megfelelő hígítóközeget alkalmaztuk. A kinetikai kísérleteket szintén a BioTek Powerwave XS készüléken, vagy Agilent Cary 8454 diódasoros spektrofotométeren végeztem. A pontos koncentrációk meghatározására használt metilénkék, hideg cianolízis, Bradford és bicinkoninsav (BCA) módszerek során az abszorbanciát a megfelelő hullámhosszon mértük, a pontos koncentrációkat pedig előzetesen felvett kalibrációs egyenesek alapján számítottuk ki.

3.2.2. Tömegspektrometriával kombinált folyadékkromatográfia

A szervesetlen poliszulfidok analizését elválasztási lépés nélkül, a szervesetlen poliszulfid oldatok elektroporlasztásos (ESI) ionforrásba történő direkt infúzióját követően végeztük Waters SYNAPT G2-Si ESI-TOF-MS készüléken, vagy előzetes alkilálást követően UHPLC-MS/MS módszerrel, Xevo TQ-S detektorral kapcsolt Waters Acquity UPLC rendszer segítségével.

A poliszulfidált CySH és GSH adduktok LC-ESI-MS/MS analizését Nexera UHPLC rendszerrel (Shimadzu) kapcsolt triple quadrupole (Q) LCMS-8050 tömegspektrométeren hajtottuk végre.

A dimedonnal jelölt poliszulfidált minták tripszines emésztését és triklórecetsavas kicsapását követően a felülűszót LC/MS-MS analízisnek vetettük alá, amely Thermo Ultimate 3000 HPLC rendszerrel kapcsolt Thermo LTQ-XL lineáris ioncsapda tömegspektrométeren történt.

A poliszulfidált GSH származékok UPLC-MS/MS analizését Waters Acquity UPLC rendszerrel kapcsolt Xevo TQ-S kvadrupól tömegspektrométeren (Waters) végeztük.

A poliszulfidált és oxidált, majd dimedonnal jelölt CysSH származékok LC-ESI-MS/MS analízise Nexera UHPLC rendszerrel (Shimadzu) kapcsolt triple quadrupole (Q) LCMS-8050 tömegspektrométeren (Shimadzu) történt.

A származékok azonosítása minden esetben tandem tömegspektrometriával történt, mennyiségüket pedig SRM módban határoztuk meg.

3.2.3. Fehérjeszintű vizsgálatok

PMSA

A redukáló pufferben tárolt tisztított humán rekombináns GAPDH-t sómentesítettem a redukáló közeg eltávolítása végett. Ezt követően a fehérjemintákat Na_2S_2 illetve Na_2S_3 hozzáadása után inkubáltam, majd a poliszulfidok feleslegét egy újabb sómentesítési lépésben távolítottam el. A pontos fehérjekoncentrációt BCA módszerrel határoztam meg, majd a fehérjetartalom kiegyenlítése után a mintákat biotin-PEG36-maleimid reagenssel inkubáltam a poliszulfidált oldalláncok jelölése céljából. Ezt követően a mintákat többféle elektrofil ágenssel kezeltem (IAM, MBB, NEM, DTNB), majd 2-merkaptóetanol jelenlétében/hiányában forraltam őket. A mintákat $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam, majd gélelektroforézis és Coomassie festés segítségével határoztam meg a GAPDH poliszulfidációjának mértékét, illetve az egyes elektrofil ágensek általi poliszulfid láncchasítás mértékét.

Humán szérum albumin minták készítése ProPerDP eljáráshoz

A fehérje előredukcióját, majd pontos koncentrációjának meghatározását követően előzetesen elkészített és tisztított SSNO^- illetve kontroll oldattal való kezelését szobahőmérsékleten, fénytől védve hajtottam végre. A két reakcióelegyből 0, 20, 40 és 60 percnél mintákat vettem, melyeket a poliszulfidált módosulatok stabilizálása végett jó-dacetil-PEG-biotin hozzáadása után inkubáltam. Az alkilálószer feleslegét sómentesítés és ultaszűrés segítségével távolítottam el. A mintákban lévő biotinilált származékokat specifikusan kötöttem meg mágneses részecskeszeparátor segítségével, miután a mintákat sztreptavidinnel bevont mágneses gyöngyökkel szobahőmérsékleten és rázóasztalon inkubáltam. A felülúszó eltávolítása után a gyöngyöket TBST-vel mostam a nem specifikus kölcsönhatások megszüntetése végett, majd a gyöngyöket TCEP oldatban újraszuszpendálva inkubáltam szobahőmérsékleten, enyhe ráztatás mellett. A felülúszót eltávolítottam és 4X SDS-PAGE feltöltőpufferben hígítottam, majd a gyöngyöket 1X SDS-PAGE feltöltőpufferben forraltam. A mintákat a gélelektroforézis és western blot analízis végrehajtásáig $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam.

SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Kísérleteim során a mintákból általában ~50 ng fehérjét tartalmazó mennyiséget vittem fel a 12%-os SDS–PAGE gélek kújaiba. 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.

Coomassie Brilliant Blue gélfestés

Elektroforézist követően legalább 15 percig fixáltuk a géleket 40% etanol–10% ecetsav vizes oldatában, majd QC Colloidal Coomassie festőoldatba helyezve inkubáltuk őket 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.

Western blot, előhívás

A blottolás során a membránt szorosan a géltre illesztettük, majd blottoló készülék (Bio–Rad) segítségével újabb elektroforézist hajtottunk végre a gél síkjára merőlegesen. A blottolást követően a membránokat egy éjszakán keresztül blokkoltuk, majd másnap az elsődleges és másodlagos antitest oldatában inkubáltuk. A két inkubálás között a membránt TBST-vel mostuk a nem specifikus kölcsönhatások megszüntetése végett. Végül a fehérjemintázatot 5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát–nitro tetrazólium festékkel tettük láthatóvá, majd a mintázat dokumentálását követően a mennyiségi kiértékelést Image J szoftverrel (National Institutes of Health) végeztük.

3.2.4. Sejtkultúrák és kezelések

HEK293 sejtek és kezelésük

Az American Type Culture Collection-tól vásárolt, majd a Karolinska Egyetemen Prof. Elias Arnér kutatócsoportja által stabilan transzfektált HEK293 sejteket fetalis borjú

szérummal, L-glutaminnal, penicillinnel és sztreptomicinnel kiegészített Dulbecco's-Modified Eagle Mediumban (DMEM) tartottuk fent. Kezelés előtt a sejteket médiummal mostuk, majd a szulfán kén specifikus SSP4 festék oldatával inkubáltuk. A festék feleslegének eltávolítása végett a sejteket kétszer mostuk a médiummal, majd tisztított SSNO⁻ oldattal kezeltük, a fluoreszcencia időbeli változását pedig mikroszkóppal követtük.

TRPA1 expresszálo és TRPA1 deficiens CHO sejtek és kezelésük

Kísérleteink során a sejten belüli Ca²⁺ szint növekedését tanulmányoztuk, amely a receptorok aktivációjához rendelhető. Hogy igazoljuk, a kezelés hatására megemelkedett [Ca²⁺] 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 Farmakoterápiai Intézetben Dr. Sándor Zoltán állította elő és biztosította számunkra.

A TRPA1-gyel stabilan transzfektált CHO sejteket hőkezelt fetális borjú szérummal, L-glutaminnal, nem esszenciális aminosavoldattal, penicillinnel és sztreptomicinnel kiegészített Dulbecco's-Modified Eagle Mediumban (DMEM) tartottuk fent. Kezelés előtt eltávolítottuk a médiumot, majd tripszin oldattal emésztettük a sejteket. Mintánként 10⁴ db TRPA1-et expresszálo CHO sejtet reszuspendáltunk a módosított médiumban, majd a fluoreszcens kalcium érzékeny Fluo-4 AM festékkel inkubáltuk őket. ECS oldat hozzáadása után a kapott szuszpenziót tisztított SSNO⁻ 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 kezelt sejtekre kapott értéket tekintettük.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Reaktív kénszármazékok detektálása biológiai rendszerekben

Nátrium–diszulfid, nátrium–trisulfid, és technikai minőségű kálium–poliszulfid oldatok származékképzés nélküli ESI–MS analízise során megállapítottuk, hogy a detektált speciáció a kiindulási formától függetlenül rendkívül hasonló, összetétel tekintetében pedig a triszulfid gyökanyon (S_3^-) a meghatározó részecske. Emellett a diszulfid (S_2^-) és tetraszulfid gyökanyonok (S_4^-) is számottevő mennyiségben detektálhatók az oldatokban, illetve a tioszulfát gyökanyonos ($S_2O_3^-$), és protonált formájának, valamint HSO_4^- jelenlétét is sikerült igazolnunk. A gyökök jelenlétét azonban 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.

A szerves poliszulfidok származékképzésére vonatkozóan két különböző alkilálószer, a jóacetamid (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 S1–S4 adduktokat sikerült detektálnunk, míg IAM esetében hosszabb láncú módosulatok (S1–S7) is megjelentek a kromatogramokon. A direkt infúziós kísérletekhez hasonlóan, a spektrális mintázat az összes forma esetén rendkívül hasonló volt, azonban az egyes alkilálószer koncentrációja befolyásolta a részecskék eloszlását. A két alkilálószer eltérő hatását az alkilálás eltérő sebessége, valamint az alkilálás eltérő mechanizmusa is magyarázhatja.

A két alkilálószer közötti különbségek tanulmányozása végett első lépésben tízszeres IAM felesleg alkalmazása mellett alkiláltuk a poliszulfidokat, majd ezt követően NEM–mel reagáltattuk a már „előalkilált” elegyet. NEM hozzáadása után is sikerült detektálnunk az S1–S3 poliszulfid–IAM adduktokat, azonban már sokkal kisebb mennyiségben. A hosszabb láncú származékok 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 mechanizmusára több javaslatot tettünk, melyek közül a poliszulfidok hidrolitikus egyensúlyi reakcióinak eltolását vizsgáltuk részletesebben. Utóbbi modell ugyanis a szulfénsavak detektálására használt alkilálási eljárások tekintetében is releváns és biológiai kontextusban megkérdőjelezi az alkalmazott eljárások validitását, amelyre a későbbiekben kísérletesen is rávilágítottunk.

A szerves poliszulfidok eloszlásának tanulmányozását követően a cisztein (CySH) és glutation (GSH) poliszulfidációjára fókuszáltunk. 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. Mivel detektálásuk szintén egy kezdeti származékképzésen alapszik, a következőkben szisztematikusan megvizsgáltuk, hogy vizes oldatban az alkilálás hogyan befolyásolja speciációjukat. Egy újabban kifejlesztett, tömegspektrometrián alapuló eljárás segítségével többféle inkubálási idő és koncentráció speciációra gyakorolt hatását tanulmányoztuk három alkilálószer: a jódetamid hidroxifenil analógja (HPE–IAM), a klinikai minták analízise során széles körben használt monobromobimán (MBB) és a már említett N–etilmaleimid (NEM) alkalmazása mellett.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az általunk alkalmazott körülmények között a HPE–IAM koncentrációja csak elenyésző mértékben befolyásolta a cisztein- és glutation–perszulfid adduktok mennyiségét.

NEM-mel elvégezve a kísérleteket, teljesen eltérő eloszlási mintázatot detektáltunk. Megfigyeléseink megerősítették, hogy NEM alkalmazása mellett inkább az alkilált tiolok képződése preferált. Meglepő módon a ciszteinnel ellentétben az inkubálási idő illetve a koncentráció a glutation–perszulfid módosulat mennyiségét nem befolyásolta kiugró mértékben, illetve ezen részecskét sokkal nagyobb mennyiségben sikerült detektálnunk az analóg cisztein származékokhoz 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 kevésbé befolyásolta a perszulfid módosulatok koncentrációját, ellenben az MBB koncentrációjának növelése a triszulfid adduktok mennyiségének növekedéséhez vezetett. Magasabb MBB koncentrációk esetén azonban az inkubálási idő növelésével

csökkent a triszulfid adduktok mennyisége, amely arra enged következtetni, hogy idővel a NEM-hez hasonlóan az MBB is elhasítja a hosszabb láncú módosulatokat.

A következőkben a poliszulfid láncok alkilálószerrek általi lánchasítását tanulmányoztuk a *gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz* fehérjén (GAPDH) egy újonnan kifejlesztett detektálási eljárás (PMSA) segítségével, melynek alapja a poliszulfidált oldalláncok NEM általi hasítása. Eredményeink alapján az alkalmazott alkilálószer minősége nagyban befolyásolta a kapott mintázatot: a kismolekulákhoz hasonlóan a NEM hasította legintenzívebben a már alkilált GAPDH 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-merkaptóetanol hatásával, ami arra enged következtetni, hogy ez az ágens elhasította az összes poliszulfidált cisztein oldalláncot.

4.2. Cisztein–poliszulfénsavak dimedonos detektálása

A poliszulfid láncok alkilálás indukálta hasítási mechanizmusára javasolt modellek közül a hidrolitikus egyensúlyok eltolása rendkívül komoly és megfontolandó kérdéseket vet fel a fehérje szulfénsavak detektálását illetően, ugyanis a cisztein–szulfénsavak megváltozott mennyiségét eredményezheti. Ennek legfőbb következménye pedig az lehet, hogy a biológiai rendszerekben szulfénsavként detektált módosulatok egy része valójában per- és poliszulfid módosulatokat reprezentál.

A cisztein–perszulfidok oxidációja során keletkező úgynevezett pertioszulfénsav köztitermékek ugyanúgy célpontjai lehetnek a szulfénsavak detektálása során alkalmazott 1,3-diketonoknak. Ezt a feltételezést mind elméleti kémiai számolások, mind kísérletes eredmények segítségével igazoltuk.

A poliszulfidált ciszteinek hidrolitikus reakcióját illetően a képződő szulfénsavak dimedonos alkilálása az irreverzibilis származékképzés révén a termékképződés felé tolja el az egyensúlyt. Ennek következtében a szulfénsavként detektált módosulatok egy része feltehetőleg az eredetileg poliszulfidált állapotban lévő részecskéket reprezentálja. Erről a feltételezésünkről kísérletesen is meggyőződöttünk, GAPDH modellfehérje alkalmazásával. A fehérjét előredukció után peroxidos illetve szervesen poliszulfidos kezelésnek vetettük alá, melyet követően dimedonnal detektáltuk a

cisztein–szulfénsav módosulatokat. Meglepő módon a poliszulfidokkal kezelt mintákban detektáltuk a legtöbb dimedonnal jelölt származékot annak ellenére, hogy ez a kezelés nem vezet direkt szulfénsav képződéshez. Kísérleteink eredményei arra engednek következtetni, hogy a korábban szulfénsavként azonosított származékok egy része a kémiai egyensúlyok eltolása következtében valójában poliszulfidált módosulatokat reprezentál.

4.3. A kénhidrogén és nitrogén–monoxid által vezérelt jelátviteli útvonalak összefonódása

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 köztitermék, a nitrozoperszulfid (SSNO⁻) kémiai és biológiai hatásának tanulmányozása volt.

Spektrális és kinetikai kísérleteim eredményei alátámasztották, hogy az általam, a nitrogén–monoxid donor S-nitrozo-N-acetil-DL-penicillamin (SNAP) és feleslegben lévő szulfid reakciójával, vizes közegben előállított nitrozoperszulfid a korábban PNP⁻SSNO⁻-ként előállított nitrozoperszulfiddal azonos spektrális tulajdonságokkal rendelkezik, valamint az NO–szulfid kölcsönhatás meghatározó köztiterméke.

Az SSNO⁻ előállítás során melléltermékként keletkező poliszulfidok szelektív redukcióját tanulmányozva a *tris(2-karboxietil)foszfin* (TCEP) nem bizonyult szelektívnek, míg a diszulfidok redukciójára széles körben használt *D,L-ditiotreitolt* (DTT) immobilizált formában tartalmazó redukciós oszlop nem bizonyult kellő hatékonyságúnak.

A sejten belüli diszulfidkötések redukciójáért felelős tioredoxin (Trx) és glutation (GSH) enzimszisztémák tanulmányozása során kapott eredményeim arra engednek következtetni, hogy sem a tioredoxin, sem a glutation rendszer komponensei nincsenek hatással a nitrozoperszulfid stabilitására, azaz nem redukálják azt. Ez a felfedezés egyben rendkívül fontos biokémiai következményt is jelent, ugyanis az SSNO⁻ ellenálló a szervezetben működő enzimszisztémák redukív kapacitásának, szulfán kén transzfer molekulaként funkcionálhat, lassú bomlása pedig szervesen poliszulfidok képződését eredményezi, amelyek cisztein–poliszulfid poszttanszlációs módosulatok

generálásán keresztül vesznek részt jelátviteli folyamatokban. Az SSNO⁻ által kibocsátott szerves poliszulfidok jelenlétét tömegspektrometriával kombinált folyadékkromatográfiás analízissel is igazoltam.

A nitrozoperszulfid általi késleltetett poliszulfidációt több biológiai is releváns modellen is tanulmányoztam. Redukált glutation SSNO⁻-s kezelését követően tömegspektrometriával kombinált folyadékkromatográfiás analízis segítségével detektáltuk a poliszulfidált glutation módosulatok időbeli megjelenését, amely alátámasztotta a nitrozoperszulfid elnyújtott poliszulfidációs hatását.

A késleltetett poliszulfidáció tanulmányozását humán szérum albumin modellfehérjén is elvégeztem, melynek során a fehérje kezelését követően a ProPerDP módszer segítségével detektáltam a fehérje cisztein–perszulfidokat. 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 az enzimatis poliszulfidredukció hatékonyságát is alátámasztotta. A keletkező HSA–SSH időben növekvő mennyisége konzisztensnek mutatkozott az SSNO⁻ mennyiségének időbeli csökkenésével, megerősítve a nitrozoperszulfid általi indirekt, elnyújtott hatást.

A nitrozoperszulfid szulfán kén donor tulajdonságát HEK293 sejteken is tanulmányoztuk. Az SSNO⁻ kezelés időben növekvő fluoreszcens jelet idézett elő a szulfán kén specifikus SSP4 festékkel előzetesen megfestett 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⁻ sejten belüli per- és/vagy poliszulfidációs folyamatokat idézhet elő.

Az SSNO⁻ *transziens receptor potenciál ankyrin 1* (TRPA1) receptorokra gyakorolt hatását vizsgálva TRPA1-et expresszáló, valamint TRPA1 negatív CHO sejteken vizsgáltuk a melléktermékektől nagymértékben megtisztított SSNO⁻, illetve a kontroll elegy hatásának idő- és koncentrációfüggését. Várakozásainknak megfelelően a kontroll oldattal kezelt sejteken az aktiváció mértéke időben lecsengő tendenciát mutatott, megerősítve az *in situ* keletkező, tisztítás során nem eltávolítható szerves poliszulfidok által kiváltott átmeneti aktivációt. A sejtek nitrozoperszulfidos kezelését követően detektált Ca²⁺-influx időfüggése elnyújtott aktivációra enged következtetni, azaz az SSNO⁻ potenciális bioaktivással rendelkezhet a TRPA1 ioncsatornák aktivációjának tekintetében. A TRPA1 deficiens CHO sejtek egyik esetben sem

reagáltak a kezelésre, amely megerősíti azt, hogy az általunk detektált Ca^{2+} beáramlás specifikusan, a TRPA1 aktiváció következtében jelenik meg.

5. Új eredmények összefoglalása

1. A szervetlen és szerves poliszulfidok oldatbeli speciációját tanulmányozva, valamint a GAPDH fehérjén végzett kísérleteink során 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.

2. A GAPDH fehérjén elvégzett PMSA eljárás során detektált mintázat arra enged következtetni, hogy a rekombináns GAPDH tiol oldalláncain detektálható poliszulfidált módosulat.

3. Ha a reaktív kénszármazékok detektálását alkilálást követően végezzük – amely lépés elengedhetetlen a reaktív és instabil részecskék stabil származékká alakításához – az alkiláló ágens természete befolyásolja a szervetlen poliszulfidok speciációját és markáns különbség figyelhető meg az egyes alkilálószerkezetek között.

- Szervetlen, cisztein, glutation és GAPDH poliszulfid modellek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a széles körben alkalmazott, rendkívül erős elektrofil ágens N-etilmaleimid (NEM) nem csak a poliszulfid láncok végén lévő, hanem a láncközi kéntomokra is támad, a poliszulfid láncok hasítását eredményezve
- Ez a hasítás lejátszódhat akár egy előzetes alkilálást követően dialkil poliszulfid származékok esetén is, 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

4. A poliszulfidok alkilálás általi lánchasításának mechanizmusát tanulmányozva eredményeink arra engednek következtetni, hogy a korábban kizárólag szulfénsavként azonosított, dimedonnal jelölt származékok nagy része valójában poliszulfidált módosulatokat reprezentál, mert a poliszulfidok hidrolízisekor keletkező poliszulfénsavak specifikus megkötése eltolja a hidrolitikus egyensúlyokat.

5. Az S–nitrozo–N–acetyl–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.

6. 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

vizsgálva megmutattam, hogy egyik enzimátikus rendszer komponensei sincsenek hatással a nitrozoperszulfid stabilitására és bomlására, azaz ideálisak lehetnek a szervesetlen poliszulfidok szelektív és hatékony redukciójára SSNO⁻ mellett.

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

8. Az SSNO⁻ általi elnyújtott poliszulfidációt több biológiaiag is releváns modellen megmutattuk:

- Redukált glutation SSNO⁻ kezelését követően, LC-MS analízist alkalmazva 1–7 kénatomot tartalmazó poliszulfidált módosulatokat detektáltunk, amelyek időfüggő képződése megerősíti az SSNO⁻ bomlása során képződő szervesetlen poliszulfidok általi hatást
- Humán szérum albumin nitrozoperszulfidos kezelését, majd a fehérje–perszulfidok detektálására alkalmas ProPerDP eljárást alkalmazva időben növekvő humán szérum albumin–perszulfid mennyiséget sikerült kimutatnunk, amely korrelált az SSNO⁻ időben csökkenő mennyiségével, szintén megerősítve a nitrozoperszulfid általi elnyújtott perszulfidációt
- A szulfán kén specifikus SSP4 festékekkel előzetesen megfestett TRP14 csendesített HEK293 sejteket nitrozoperszulfiddal kezelve időben növekvő fluoreszcens jelet detektáltunk, igazolva a nitrozoperszulfid intracelluláris szulfán kén donor tulajdonságát
- A nitrozoperszulfid által kibocsátott szervesetlen poliszulfidok hatását a TRPA1 receptorok aktivációjának tanulmányozásán keresztül is megvizsgáltuk. A receptort stabilan expresszáló CHO sejtek SSNO⁻ -val való kezelését követően az idő előrehaladtával növekvő aktivitást figyeltünk meg. A receptort nem expresszáló, TRPA1 deficiens sejtek kezelése nem eredményezett Ca²⁺ beáramlást, amely megerősítette, hogy az általunk detektált jel az ionsatornák aktivációjához rendelhető.

9. 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 a nitrozoperszulfiddal ellentétben, amely időben elnyújtott hatást indukál szerves poliszulfid bomlástermékei által.

6. Az értekezéshez kapcsolódó dokumentált publikációs tevékenység

6.1. 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 Akaïke, 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 Akaïke, Péter Nagy

Speciation of Reactive Sulfur Species and Their Reactions with Alkylating Agents: Do we have any clue about what is present inside the cell? (elsőszerzős publikáció idegennyelvű tudományos folyóiratban)

British Journal of Pharmacology, 176, 646-670

Megjelenés: 2019, IF: 6,810

4. Christopher Bianco, Takaaki Akaïke, 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, 176, 671-683

Megjelenés: 2019, IF: 6,810

5. Virág Bogdándi, István Zoárd Batai, 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)

Free Radical Biology and Medicine Volume 120, Supplement 1, S128
Megjelenés: 2018

6. Virág Bogdándi, István Zoárd Batai, 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

6.2. Az értekezéshez kapcsolódó konferencia előadások, poszterek 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, Sággy 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 Bátai, 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 kén-szármarazékok 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 SFRRRI 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 újabb azonosított szulfán kén donor molekula, elnyújtott és széleskörű fehérje per- és polisulfidációs hatással
Az MTA Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottság, a Koordinációs Kémiai Munkabizottság és a VEAB Kémiai Szakbizottság közös Tudományos Ülése
2018. november 9., Veszprém

15. Bogdándi Virág

Kénhidrogén által vezérelt jelátviteli folyamatok molekuláris mechanizmusai
A Magyar Kémikusok Egyesülete CHINOIN munkahelyi csoportjának rendezvénye
2019. május 16, Budapest

16. Bogdándi Virág, Nagy Péter

Cisztein származékok poliszulfidációjának biológiailag releváns mechanizmusai
A Magyar Tudományos Akadémia Reakciókinetikai és Fotokémiai
Munkabizottságának Tudományos Ülése
2019. május 24., Balatonalmádi

17. Bogdándi Virág, Batai 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 (poszter)**
MKE Vegyészkonferencia
2019. június 24–26., Eger