

Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály

OXIDATÍV STRESSZ és REDOXIJELÁTVITEL Betekintés a redoxibiológia molekuláris világába

Nagy Péter MTA Doktori értekezés 2015





dc_1137_15

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	1
2	Célkitűzések	2
3	Vizsgálati módszerek	3
4	Tudományos eredmények és azok jelentősége	5
<i>4.1</i>	A szuperoxid reakciója tirozin szabadgyökökkel ^{C2-C6}	5
4.1	1.1 A szuperoxid és tirozin szabadgyökök reakcióinak mechanizmusa	6
4.1	1.2 Stimulált humán neutrofilek, mieloperoxidáz enzimük segítségével, sz	uperoxid
ad	ldíció útján oxidálják opioid peptidek tirozinjait	18
4.1	1.3 Normál enzimműködés közben képződő fehérje-Tyr szabadgyökök red	ıkciója
SZU	uperoxiddal	
4.1	1.4 Oxidativ stressz hatására képződő fehérje-Tyr szabadgyökök és szup	eroxid
rec	akcioja	
4.1	1.5 ApoAI jenerje koleszterin szallíto junkciojanak gatlasa sugarterápia	natasara
12	Cisztain tiolok vadovibiokámiáiaC7-C25. B1. B2	
4. 2 17	Ciscien uolok redoxiolokemiuju 2. 1. A cisztein tiolok reaktivitásának rövid hemutatása	
4.2	$2.1 \qquad A cisztem norok reaktivitasának rövia bematatásá2.2 Az oxidáló ágensek$	
4.2	2.3 Cisztein reakciói (nszeudo) hipohalogénessavakkal	
4.2	2.4 Oxidált Cvs-származékok másodlagos reakciói	
4.2	2.5 Cisztein reakciói peroxiddal	
4.2	2.6 Tiol fehérjék reakciói peroxiddal	
<i>4.3</i>	A hidrogén-szulfid által vezérelt sejten belüli jelátviteli folyamatok mole	kuláris
mec	hanizmusai ^{C26-C35, B3}	
4.3	3.1 Perszulfidok képződése, lebontása és biológiai szerepe	
4.3	3.2 A szulfid kölcsönhatása hem-fehérjék vas centrumaival	109
4.3	3.3 A szulfid- és NO-vezérelt jelátviteli útvonalak kommunkációja kémia	
SZE	emszögből	
5	Kitekintés és a dolgozatban ismertetett eredmények jövőbei	ni
hasz	mosításai	126
6	Köszönetnyilvánítás	130
7	Irodalomjegyzék	131
8	Publikációk	140
8.1	A dolgozatban említett könyvfejezetek	
8.2	A dolgozatban összefoglalt tudományos közlemények	
<i>8.3</i>	A dolgozat témájához kapcsolódó meghívott előadások	143
9	Röviditések	146

1 Bevezetés

A "redoxibiológia" mint fogalom az angol nyelvű szakirodalomban már elterjedt kifejezés. Sőt ezen a néven egy ma már nemzetközileg is elismert folyóirat is indult 2013ban¹. A redoxibiológia területe a **R**eaktív **O**xigén **S**zármazékok, ROS-ok néven elterjedt szabadgyökök és oxidálószerek biológiai hatásaival foglalkozik^{2, 3}.

Biológiai rendszerekben ROS-ok arzenálja képződik egyrészt a normális sejtműködés, másrészt külső tényezők indukáló hatásai révén⁴. Az aerob organizmusok például nagy koncentrációban termelnek ROS-okat a mitokondriális sejtlégzés melléktermékeként⁵, de oxidálószerek/szabadgyökök célzott termelése szabályozza az immunsejtek antibakteriális tulajdonságait is⁶⁻⁹. ROS-ok képződéséhez vezet továbbá egyes gyógyszerek, xenobiotikumok metabolizmusa és az UV vagy kozmikus sugárzás.

Eleinte a terület a ROS-ok toxikológiai vonatkozásaira fókuszált kimagasló és gyakran nem szelektív reaktivitásuk okozta roncsoló hatásaik miatt. Ezeknek köszönhetően ugyanis bizonyítottan főszerepet játszanak számos gyulladásos és daganatos megbetegedés kialakulásában és progressziójában, illetve az öregedési folyamatokban¹⁰. A toxikológiai vizsgálatok később a szervezet által termelt antiioxidáns enzimek és kismolekulák, illetve az oxidatív stressz hatás észlelésére és az ahhoz való adaptáció vezérlésére "szakosodott" jelátviteli utak felfedezéséhez vezettek. A mondern redoxibiológiai kutatások pedig a normál sejtműködés redoxireakciók által vezérelt jelátviteli útvonalaira öszpontosítanak.

A ROS-ok elsődleges biológiai célpontjai a kéntartalmú aminosavak, a metionin és a cisztein. A ciszteinben a kén centrum alacsony oxidációs állapota és szoft karaktere felelős a tiol funkciós csoport erélyes nukleofil ágensként való viselkedéséért^{*B*2}. Kémiai szempontból a legkisebb tiol a hidrogén-szulfid, amely szintén alapvető szerepet tölt be a sejtfunkciók vezérlésében. Érdekes, hogy a H₂S esetén is a kezdeti tanulmányok a vegyület toxikus tolajdonságaira irányultak, de később, mikor tisztázódott, hogy a szulfid a Cys transszulfurációs utakon történő endogén metabolizmusának a terméke, és fontos jelátviteli tulajdonságai vannak¹¹⁻¹⁴ a kutatók figyelme a hidrogén-szulfid fiziológiás tulajdonságaira tolódott el¹⁵⁻¹⁷. A szulfid biokémiája nem független a fehérje Cys tiolokétól, sőt, jelátvitelt vezérlő hatásait nagyrészt tiol fehérjék funkcióinak redoxireakciók általi vezérlésén keresztül fejti ki^{18, 19,C1, B3}.

A fehérjék Tyr aminosav komponensei is fontosak redoxibiológiai szempontból, leginkább szabadgyökökkel reagálnak. Az egyelektronos oxidáció eredményeképp képződő

fenoxil szabadgyök nemcsak toxikológiai szempontból jelentős, hanem több enzim (pl ribonukleotid reduktáz) normál katalitikus ciklusának is köztiterméke.

Doktori értekezésemben a tiolok és Tyr-származékok ROS-okkal való redoxireakcióinak kémiai és biológiai vonatkozású kutatásában elért eredményeimet mutatom be.

2 Célkitűzések

A redoxibiológia és a hidrogén-szulfid fiziológiai tulajdonságai intenzíven kutatott területek. A biológiai, gyógyszerészeti és orvosi vonatkozású tudományos közlemények számának robbanásszerű növekedése figyelhető meg az irodalomban, de sajnos ezzel ellentétben a biológiai hátasokért felelős kémiai reakciók molekuláris mechanizmusai kevéssé ismertek. Ebből adódóan a szakirodalomban számos ellentmondásos közlemény található. Tudományos munkám elsődleges célkitűzése ezért a redoxibiológiai rendszerek hátterében lévő kémiai reakciók tanulmányozása és ezáltal az említett ellentmondások okainak feltárása Ezt elsősorban kinetikai megközelítéssel, részletes reakciómechanizmusok kidolgozásával próbáljuk megvalósítani. Kutatásaink többnyire aminosavak, peptidek és fehérjék ROS-okkal való reakcióira fókuszál. A fehérjék leginkább redoxiaktív alkotóelemei az aminosav komponenseik kén- vagy nitrogéntartalmú, illetve aromás funkciós csoportokat tartalmazó oldalláncai. Mindezek fényében a dolgozatomban összefoglalt eredményeinket három fő célkitűzés vezérelte:

1) Az első részben a fehérjék és peptidek Tyr aminosav alkotóelemeinek tirozil szabadgyök képződését és ezek szuperoxiddal való reakcióinak vizsgálatait tűztük ki célul. A reakciókat peroxidáz enzimek működése, neutrofil fagocitáknak a veleszületett immunitás és a neuroendokrin rendszer közti kommunikációban betöltött szerepe, Tyr szabadgyökök képződésével járó normál enzimműködés és a sugárterhelés hatására bekövetkező fehérjekárosodás vonatkozásaiban vizsgáltuk.

2) A dolgozat második része a cisztein tiolok ROS-okkal való reakcióira fókuszál. Kísérletes munkáink a ROS-ok oxidatív stresszt okozó és ezek antioxidánsokkal való ellensúlyozása, a sejtek oxidatív terhelésének mérséklését segítő metabolikus adaptációs mechanizmusok és a redoxireakciók által vezérelt jelátviteli utak molekuláris mechanizmusainak felderítésére irányulnak.

2

3) A disszertációm utolsó fejezetében a hidrogén-szulfid, mint kis jelátviteli molekula, kémiai, biológiai és fiziológiás tulajdonságainak tanulmányozását tűztük ki célul. Ez a kutatócsoportom által jelenleg legintenzívebben kutatott terület.

3 Vizsgálati módszerek

A dolgozatban összefoglalt eredmények eléréséhez kinetikai, szerkezetvizsgálati, analitikai kémiai, biokémiai és sejtbiológiai módszereket egyaránt alkalmaztuk. Jelenleg az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztályát vezetem, amely egy multidiszciplináris csoport lévén felkészült és diák sejtbiológus bioinformatikus és kémikus kollégákból áll. Ezért problémaorientált kísérletes munkáinkat módszerek széles arzenáljának igénybevételével végezzük. A dolgozatban összefoglalt eredmények vizsgálati módszereinek részletes tárgyalása terjedelmi okok miatt lehetetlen lenne, ezért azokat csak összefoglaló jelleggel tárgyalom ebben a fejezetben. A konkrét eredmények tárgyalásánál a szükséges kísérleti részletekre kitérérek, emellett az értekezéshez kapcsolódó közlemények az alkalmazott kísérleti metodikát, beleérve az eredmények reprodukálhatóságát is, részletesen bemutatják.

Kinetikai méréseink részben direkt, részben pedig kompetíciós reakciók segítségével történtek "egyszerűbb" kémiai és enzimatikus rendszerekben egyaránt. Gyorskinetikai módszerek közül a *stopped-flow* és a (házi gyártmányú készülékkel végzett)^{C23} *quenched-flow* technikák voltak dominánsak. A *quenched-flow* módszerünk érzékenységének és sebességi állandó tartományának kiterjesztése érdekében egy tömegspektrometriás detektáláson alapuló termékanalízis módszert is kifejlesztettünk, aminek segítségével a μ M-os tartományba tudtuk a reaktánsok koncentrációit leszorítani. Erre fehérjék nagyon gyors redoxireakcióinak (pL peroxiredoxinok peroxidokkal való reakciói) követésénél volt nagy szükség, ahol a kísérleteket a denaturáció elkerülése végett csak pH = 7 környékén lehet végezni. Enzimkinetikai mérések széles skáláját használtuk például a *glutation oxidoreduktáz* vagy *mieloperoxidáz* enzimek különböző aktivitásainak követésére.

Szerkezetvizsgáló, minőségi analitikai munkáinkhoz leginkább spektrofotometria, spektrofluorimetria, NMR és EPR spektroszkópia, tömegspektrometria, ionkromatográfia illetve CD spektroszkópia módszereket használtunk.

Mennyiségi analitikai kísérleteinket egyrészt irodalmi adatok alapján, másrészt általunk beállított klasszikus analitikai vizsgálatokkal, HPLC-s elválasztási módszerekkel

3

egybekötött UV-látható, fluoreszcens vagy tömegspektrometriás detektálási módszerekkel végeztük.

Az anaerob körülmények megteremtésére, illetve az oldatokban a gázcsere kivitelezésére vagy argonnal való buborékoltatást, vagy a Schlenk technikát alkalmaztuk.

Az oldatok pH-ját klasszikus sav-bázis titrálási módszerekkel, pH indikátorokkal becsültük, vagy pH elektródok segítségével határoztuk meg. A mért pH-t a kísérleti körülményeknek megfelelően Irving és munkatársai módszerével –lg[H⁺]_{egy} értekre és az adott hőmérsékletre/oldószerre (pl deuterált közeg) korrigáltuk.

Savi disszociációs állandókat pH-potenciometriásan, spektrofotometriás titrálással vagy NMR kémiai eltolódások pH-függésének a mérésével határoztunk meg.

A szabadgyökök jól szabályozott előállítását kémiai (pl impulzus radiolízis, lézer flash fotolízis vagy radioterápiánál használt besugárzó berendezések), biokémiai (enzimatikus utak) vagy sejtbiológiai (pl, neutrofil fagociták stimulálása) módszerekkel valósítottuk meg.

A kísérletekben használt fehérjék és pontmutánsaik előállításához, kinyeréséhez, tisztításához és analizálásához a legkorszerűbb biokémiai módszerek együttesét vettük igénybe (pl *site directed mutagenezis*, affinitás kromatográfia stb.)

Daganatos és egészséges humánsejtes munkáinkat szintén modern sejtbiológiai módszerek széles választéka segíti (pL, fehérjék működését sejtes környezetben genetikai transzfektálási módszerek segítségével vizsgáljuk). A laboratóriumomban a sejttenyésztés és a sejtes munka egy elkülönített sejttenyésztő és sejtbiológiai helységben történik, a sterilitás szabályait betartva. A munkánk során használt sejtvonalakat rendszeresen ellenőrizzük mikoplazma szennyeződésre RT PCR technika segítségével. A sejtek fehérjéinek funkcionális és proteomikai analízisére SDS-PAGE gél-elektroforézis, Immunoblot, házilag gyártott futtató berendezéseken beállított és validált 2D gél-elektroforézis expressziós és redoxiproteomikai módszerek sokasága (ezüst festéses, Coomassie festéses, Western-blot (WB) vagy fluoreszcens detektálással), és tömegspektrometriai módszerek széles skálája (pL: LC/MS/MS, direkt infúziós módszerek, intakt fehérje és peptid alapú "shot-gun" proteomika, tripleplay proteomikai analízis, multiple reaction monitoring stb analízisek) áll rendelkezésünkre.

A neutrofil sejteket és vörösvértesteket emberi vérből izoláltuk a BPR/021/00084-2/2014 számú ETT etikai engedély alapján. A neutrofilokat forbol-mirisztát-acetáttal stimuláltuk és funkcióit jól beállított sejtbiológiai és kémiai módszerek kombinálásával tanulmányoztuk.

4

A különböző kísérleti adatok kiértékelésére számos (többek közt általunk írt) illesztő, kiértékelő és modellező programot használtunk.

4 Tudományos eredmények és azok jelentősége

4.1 A szuperoxid reakciója tirozin szabadgyökökkel ^{C2-C6}

Jelenlegi tudásunk szerint az emberi szervezetben leggyakrabban képződő szabadgyök a szuperoxid. A szuperoxid két legjelentősebb endogén forrása a sejtlégzés⁵ és a NADPH oxidáz enzimkomplex család reakciói²⁰, de képződik szuperoxid biomolekulák autooxidációja során is (pl a glutation vagy a hemoglobin autooxidációs reakciói)². A sejtlégzés közben az elektrontranszport lánc nem tökéletes működése következtében nagy mennyiségű szuperoxid "szivárog" a mitokondriális térbe leginkább az úgynevezett komplex I reakcióin keresztül⁵. A NADPH oxidáz enzimkomplex családnak pedig mára már 7 tagja ismeretes, melyek a sejt gyakorlatilag mindegyik kompartmentjébe (a citoszoltól a mitokondriumon és endoplazmatikus retikulumon át az extracelluláris térig) termelnek szuperoxidot. A ma elfogadott nézet szerint a mitokondriális elektrontranszport lánc és az autooxidációs folyamatok által termelt szuperoxid toxikus (ezt fémjelzi létfontosságú enzimünk a mangán szuperoxid dizmutáz (MnSOD) enzim²¹ amelynek egyetlen funkciója a mitokondriumban képződő szuperoxid dizmutációjának H2O2-ra és oxigénre való katalizálása), míg a NADPH komplex által generált szuperoxidnak fontos biológiai jelentőségei vannak (pl. redoxijelátviteli folyamatokban, vagy baktériumok és egyéb patogén betolakodók immunrendszer által való pusztításában)^{20, 22}.

A szervezet által termelt szuperoxidon túl külső hatások is, mint például a sugárhatás, generálnak szuperoxidot és egyéb szabadgyököket a szervezetben. Többek között az így képződő szuperoxid citotoxicitása az okozója számos megbetegedésnek (pl. daganatos elváltozások kialakulása), de ennek a folyamatnak a gyógyításban is fontos szerep jut (ironikusan a sugárterápia és egyes kemoterápiás eljárások is többek közt szuperoxid képződés segítségével pusztítják a daganatos sejteket)²³⁻²⁵.

Mindezen fiziológiás tulajdonság ismeretének ellenére a szuperoxid toxicitásának molekuláris mechanizmusai nem teljesen tisztázottak²⁶. A reakciómechanizmusokkal foglalkozó kémikus szemszögéből tekintve, a szuperoxid biológiailag jelentős reakcióinak rendkívüli sebességűnek kell lenniük, hiszen a spontán is gyors dizmutációt SOD enzimek

tovább katalizálják ($k_{kat} = ~ 10^9 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$). A szuperoxid reakcióit eleinte zárt héjú biológiailag fontos molekulákkal (aminosav komponensekkel, DNS/RNS bázisokkal stb.) tanulmányozták, amikkel viszonylag lassan reagál. Ezért sokáig kulcskérdés volt, hogy a McCord és Fridovich által felfedezett létfontosságú és jelentős mennyiségben termelt SODra²⁷ miért van szüksége a szervezetnek. Az egyik sokak által vizsgált reakció, amely elég gyors a dizmutációhoz képest és igazoltan szerepet játszik a szuperoxid toxicitásban, az a vas-kén klasztereket tartalmazó fehérjék (mint pl az akonitáz enzim) szuperoxiddal való inaktivációja²⁸. Ettől eltekintve viszont mára már elfogadott tény, hogy a szuperoxid biológiai tulajdonságainak magyarázásában az egyéb szabadgyökökkel való reakcióinak van leginkább kulcsszerepe. Ilyen például a nitrogén-monoxiddal való diffúziókontrollált reakciója, ami a toxikus peroxi-nitrit képződését eredményezi^{29, 30}.

A mi kutatásaink a szuperoxid aminosavakon, peptideken és fehérjéken képződő szabadgyökökkel való reakcióira irányulnak. A peptideken és fehérjéken a szabadgyökképződés elsődleges helye a triptofán és tirozin aminosavak aromás oldalláncai. Ha a szabadgyök képző reakció nem is ezeken a fehérjekomponenseken megy végbe, a fehérjén belüli elektrontranszfer folyamatok következtében a párosítatlan elektronok általában ezeken az aminosav egységeken koncentrálódnak. Az ebben a fejezetben összefoglalt kutatási eredményeink szuperoxid tirozin szabadgyökökkel való reakcióira vonatkoznak.

4.1.1 A szuperoxid és tirozin szabadgyökök reakcióinak mechanizmusa

A tirozin aminosav fenol oldalláncán képződő fenoxil szabadgyök nagy reaktivitásának köszönhetően rövid élettartamú. Két fenoxil szabadgyök rekombinációja az úgynevezett ditirozin ((Tyr)₂) képződését eredményezi, amelyben két tirozin aminosavat a fenol-gyűrűjükön keresztüli kovalens kötés kapcsol össze (1. reakció).



A reakció gyors, szabad tirozin aminosav-szabadgyökök esetén a mért másodrendű sebességi állandó $k = 0.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1} 3^{1}$. Az így képződő (Tyr)₂ származékok stabilak és jellegzetes fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkeznek, ezeket kihasználva biológiai

rendszerekben oxidatív stressz indukált gyökös fehérje-reakciók biomarkereiként használatosak³³⁻³⁶.

A tirozin szabadgyökök szuperoxiddal való reakciója viszont még a fenoxil szabadgyökök rekombinációs reakciójánál is gyorsabb $k = 1,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1} \text{ }^{32}$. A reakció végbemenetelét igazoltuk több Tyr-t tartalmazó peptid esetében, először a szuperoxid jelenlétében való (Tyr)₂ képződés gátlásán keresztül (1.A. ábra). A Tyr szabadgyököket torma-peroxidáz enzim segítségével generáltuk H₂O₂ jelenlétében, ahol a H₂O₂-t és a szuperoxidot xantin oxidáz enzimmel, acetaldehidből és oxigénből állítottuk elő (2-3 reakciók). Ebben a rendszerben a szuperoxid steady-state koncentrációját SOD segítségével csökkentettük.

acetaldehid +
$$O_2 \xrightarrow{XO} O_2^{\bullet-} + H_2O_2$$
 (2)

$$H_2O_2 + 2Tyr \xrightarrow{HRP} 2TyrO^{\bullet} + 2H_2O$$
⁽³⁾



1. ábra (A) dimerképződés; (B) peroxidképződés tirozint tartalmazó peptidekből. A minták összetétele: *tormaperoxidáz* (HRP), acetaldehid, XO és az adott peptid. Ezek a peptidek a HRP jó szubsztrátjainak bizonyultak, dimerizációjuk kezdeti sebessége a tirozinéhoz képest 2-16-szor nagyobb, azonos mérési körülmények között. A dimerek detektálása fluoreszcens módszerrel történt, míg a hidroperoxid képződésé a FOX módszer segítségével.^{37, 38} Az eredményekből a kezdeti időpontban mért hátteret levontuk. A peroxidhozamok ekvivalens H₂O₂ mennyiségben vannak kifejezve, amelyet ismert H₂O₂-tartalmú mintákból felvett kalibrációs görbe segítségével határoztunk meg. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy izotópos nyomjelzéssel végzett vizsgálatok alapján a FOX módszer a tirozin-hidroperoxid koncentrációját alábecsli, és a tényleges értékek a H₂O₂ ekvivalensben kifejezett értéknél megközelítőleg hatszor nagyobbak.^{C2}

A reakció végbemehet elektrontranszfer útján, ami lezárt héjú tirozint és triplet oxigént ad,³² vagy addíció útján, aminek egy tirozin-hidroperoxid (Tyr-OOH) származék a terméke (1. séma) ^{*C*2, 39}.



 séma Tirozin-hidroperoxid származékok képződésének és bomlásának javasolt mechanizmusa. Az R és R' Tyr esetében OH- és H-csoportokat jelölnek, peptidek esetében pedig aminosav egységeket. Az 1. reakció a Tyr gyökök peroxidáz-katalizált képződését mutatja. A keletkező gyökök dimerizálódhatnak (az ábrán nem látható) vagy reagálhatnak egy szuperoxid gyökanionnal (O2^{•-}) elektronátadás (2) illetve addíció (3) útján. Az addíció során rövid élettartamú hidroperoxid köztitermékek képződnek (*orto* és *para* izomerek, csak az *orto* izomert tüntettük fel). Ezek bomlásával szinglet oxigén (¹O₂) termelődését javasolták (4) vagy egy stabil részecskévé alakulnak, amelyben konjugált addíció játszódik le a terminális aminocsoporttal (R'=H, 5). Nem N-terminális Tyr esetében (R'=aminosav) az amid nitrogén vesz részt a konjugációban.^{C2}

A Tyr-OOH termékek képződését a peroxidok mérésére kifejlesztett FOX módszerrel (1.B. ábra) és tömegspektrometriásan (a prekurzor ionnál 32 Da-al való tömegnövekedés) detektáltuk (2. ábra).





2. ábra Tirozintartalmú peptidek mono- és dioxid származékainak detektálása LC/MS módszerrel. A vizsgált peptidek:(A) Leu-Enk (YGGFL), (B) YG, (C) GY. A minták összetétele: HRP, acetaldehid, XO és az adott peptid. Az *alsó kromatogramok* a natív peptidekhez tartoznak, a *felsők* pedig a monoxid és dioxid származékokhoz. Mindegyik a teljes ionáram kromatogram (TIC) egy-egy részlete. A *szaggatott vonallal* jelzett csúcsok a szuperoxid-dizmutáz jelenlétében végzett mérésekből származnak. A SOD enzim a többi peptid esetében is gátolta a mono- és dioxidképződést. A mono- és dioxid részecskéket az Endomorfin2 (YPFF) peptid esetében is detektáltuk, hasonló kísérleti körülmények között, szelektív ion-monitoring (SIM) módban.^{C2}

Az 1.B. ábrán látható, hogy a FOX módszerrel az N-terminális Tyr-t tartalmazó peptidek (YG, YPFF, YGGFL) esetében jelentős hidroperoxid képződését tapasztaltuk. Nem N-terminális Tyr-t tartalmazó peptidek (mint pl a GY) esetén ezzel ellentétben a módszer nem mutatott mérhető hidroperoxid képződést. Ennek ellenére a (Tyr)₂ képződést itt is gátolta a szuperoxid jelenléte hasonló mértékben az N-terminális Tyr-t tartalmazó peptidekéhez (1.A. ábra.) A sokkal érzékenyebb tömegspektrometriás módszerrel a GY-OOH képződése viszont már detektálható volt. Mindezen kísérleti eredmények összességében arra utalnak, hogy a szuperoxid nem N-terminális Tyr szabadgyökökkel is reagál, de ezekben az esetekben a hidroperoxid képződéshez vezető reakcióút (1. séma 3. reakció) amelyet az N-terminális Tyr-t tartalmazó peptidek esetén kvalitatív analízissel igazoltunk, hogy a domináns reakcióút az elektrontranszferhez képest (1. séma 2. reakció) háttérbe szorul.

Minden esetben detektálható egy Tyr-monoxid-származék is, amely a hidroperoxidok redukált változata (4. reakció).

$$\begin{array}{c} & & & \\ O & & & \\ HO^{-O} & & \\ HO \end{array} + Nu \longrightarrow O + \\ HO & & \\ \end{array} + Nu-OH$$

$$(4)$$

A kromatogramokban több csúcs is tartozik egy-egy Tyr-származékhoz, amelyeknek a fragmentációs spektrumai (az intenzitásokat leszámítva) gyakorlatilag megegyeznek (2. ábra). Ezek nagy valószínűséggel regio- és/vagy sztereoizomerek, ami a képződő hidroperoxid-csoport *orto/para* pozíciójából illetve a konjugált addíció sztereokémiájából adódhat.

Tömegspektrometriás analízisek sorozatával igazoltuk, hogy a Tyr-OOH származékok szerkezete biciklusos (3. ábra), ami a Tyr amin- (N-terminális Tyr esetében) vagy amid- (nem N-terminális Tyr-nál) csoportoknak a fenolgyűrűhöz való konjugált addíciója révén keletkezik. (1. séma 5. reakció).



3. ábra *Bal oldal:* **Tirozintartamú peptid-monoxidok lehetséges izobár szerkezeteinek fragmentációs spektrumai.** Célzottan előállított Tyr monoxidszármazékok. melyek szerkezete korábban NMR spektroszkópia segítségével volt meghatározva: (A) 3a-hidroxi-6-oxo-2,3,3a,6,7,7a-hexahidro-1H-indol-2-karbonsav (HOHICA), (B) 3,4-dihidroxi-

fenilalanin (DOPA) és (C) 4-hidroxi-4-alanil-ciklohexa-2,5-dién-1-on (HACHD). *Jobb oldal:* **GY peptid, GY-monoxid és GY dioxid fragmentációs spektruma**. A peptid Tyr származékok fragmentációs spektrumai (MS⁴-ig) a bal oldali (A) ábrán látható HACHD-nek megfelelő biciklusos szerkezettel voltak összhangban.^{C2}

Ez az eredmény összhangban van Von Sonntag és kutatócsoportjának impulzus radiolízissel végzett kísérleteivel, miszerint a Tyr N-terminális amincsoportjának blokkolása esetén a reakcióban tapasztalható Tyr-származék fogyása csekély, a szabad amincsoportot tartalmazó származéknál tapasztalthoz képest. Ők ezt egy olyan mechanizmussal magyarázták, ahol mindkét esetben (N-terminális és nem N-terminális Tyr szabadgyök), egy addíciós lépésben, képződik a Tyr-OOH származék, de annak stabilizációjához szükséges az amincsoport konjugált addíciója a fenolgyűrűhöz (1. séma 5. reakció). A konjugált addíció hiányában a hidroperoxid, egy epoxid jellegű átmeneti terméken keresztül, (a spinpárosítási szabálynak megfelelően) szinglet oxigén távozásával elbomlik (1. séma 4. reakció), ami a Tyr-származék regenerálódását eredményezi. Ezt a reakcióutat sikerült kísérletesen kizárni azzal, hogy szinglet oxigén képződése még nyomokban sem volt mérhető, a feltételezhetően képződő hidroperoxid köztitermék mennyiség töredékének megfelelő szinglet oxigén detektálására alkalmas módszer segítségével. (A szinglet oxigén detektálását antracén-9,10-diildietil-szulfáttal való reakciójában keletkező epoxidszármazék nagy érzékenységű tömegspektrometriás detektálásán keresztül végeztük.) Kísérleteinkkel és az irodalmi adatokkal összhangban a nem N-terminális Tyr-t tartalmazó peptidek fenoxil szabadgyökeinek szuperoxiddal való reakciójában tapasztalt csekély hidroperoxidszármazék képződésére (az N-terminális Tyr-t tartalmazó peptidekhez képest) egy alternatív mechanizmust javasoltunk. A Marcus-elmélettel összhangban az elektrontranszfer reakcióút kedvezményezett azokban az esetekben ahol a megfelelő redoxipárok közti redukciós potenciálok értékei közt relatíve nagy különbség van. Ennek értelmében a fenoxilgyök/fenolát (PhO⁻/PhO⁻) ~0,64 V redukciós potenciállal rendelkező Tyrszármazékoknak elsősorban elektrontranszfer útján kellene reagálniuk szuperoxiddal (1. séma 2. reakció)³². Javaslatunk szerint, N-terminális Tyr esetében viszont a protonált amincsoportok H-hidakon keresztül növelik a szuperoxid elektrofilicitását és/vagy redoxipotenciálját, ami az O₂/O₂^{•-} és PhO[•]/PhO⁻ redoxipárok közti potenciálkülönbség csökkenésen keresztül az addíciós reakcióútnak kedvez (1. séma 3. reakció). Ezt a feltételezést alátámasztja, hogy nagy mennyiségű amin funkciós csoportot tartalmazó vegyület hozzáadása nem N-terminális Tyr-t tartalmazó peptidek esetén (ami az

intramolekuláris hatást hivatott modellezni) a hidroperoxidszármazék kitermelésének dózisfüggő növekedését eredményezte, ami deuterizált közegben visszaszorult (4. ábra).



4. ábra Megnövekedett szuperoxid-függő hidroperoxidképződés aminok jelenlétében. (A) GY-OOH képződése Lys jelenlétében normál (\circ) és deuterált (\Box) vizes közegben. Az adatpontok a GY-OOH-hoz tartozó csúcs alatti terület relatív nagyságát mutatják az amin távollétében mért kontrollhoz képest. *Betét ábra:* GY-OOH m/z=271 értékű csúcsa Lys jelenlétében (szaggatott vonal) és távollétében (folytonos vonal). (B) HPA (\circ) és YG (\Box) dioxid származékok relatív csúcs alatti területei különböző lizin, valamint a GY(\diamond) relatív csúcs alatti területei különböző etanolamin koncentrációk mellett.^{C2}

Az 1.B. ábra másik fontos üzenete, hogy annak ellenére, hogy a Tyr N-terminális, abban az esetben, ha a peptid egy Met aminosavat is tartalmaz, az gátolja a hidroperoxidképződést. Ezzel ellentmondónak tűnhet, hogy a két extra oxigénatomot tartalmazó peptid származék (M + 32 Da) viszont nagy mennyiségben képződik (5.A-D és G. ábra). Tömegspektrometriás szerkezetvizsgálati kísérletsorozat segítségével igazoltuk, hogy ez a vegyület a hidroperoxid redukált monoxidszármazékának megfelelő biciklusos Tyrszármazékot és oxidált Met-szulfoxidot tartalmaz (5.E,F,B. ábra).





5. ábra Tirozintartalmú peptidek dioxidszármazékainak detektálása LC/MS módszerrel és YM peptid módosulatok fragmentációs mintázata. A kromatogramok a natív peptideket (szaggatott vonal) és a dioxidokat (folytonos vonal) reprezentálják, szelektív ion módban (A és C) vagy a teljes ionáram kromatogramból (B, D és G). A termékek mennyiségét (bal oldali függőleges tengelyek) a prekurzor ionhoz képest számított relatív csúcs alatti terület értékekkel adtuk meg. A dioxid képződés hozamát 10 μg/ml SOD jelenléte >90%-kal gátolta. Valamennyi peptid-monoxid származékot is detektáltunk, ez főként a mintában lévő szulfoxid szennyeződéseknek tulajdonítható. YM-S=O-ból kiindulva YM-S=O hidroperoxid és kis mennyiségű YM-S=O monoxid is képződött, ez utóbbi feltehetően az YM-S=O hidroperoxid hidrolíziséből származhatott (hasonlóan az YG és a Leu-Enk hidroperoxidok esetéhez, lásd. 2. ábra).^{C2}

Azon információk birtokában, hogy:

1) a Met szulfoxidszármazék, amelyben a Tyr aminosav nem oxidálódott illetve az a Tyr-OH származék ahol a Met redukált formában maradt volna nem volt detektálható,

2) a peptid szulfoxidszármazékokból kiindulva a Tyr-OOH-szulfoxid származékok képződtek (5.G,H. ábra) illetve

3) a Met-enkefalin példáján bemutattuk, hogy a peptid Met aminosavának a Leuenkefalin-Tyr-OOH-val való intermolekuláris oxidációja (ahol a Leu-Enk a Met-Enk-től csak a C-terminális aminosavban -Met helyett Leu- tér el) kinetikailag nem kompetens (6. ábra).

a 2. sémán látható mechanizmust javasoltuk a Met-Enk-dioxid származék képződésére. A modell szerint a szuperoxid addícióját követően a képződő Tyr-OOH-származék, entrópia-redukció által kedvezményezett, intramolekuláris reakcióúton oxidálja a Met tioéter csoportját.



6. ábra Leu-Enk hidroperoxid (Leu-Enk-OOH) és 200 μM (A) Met illetve (B) Met-Enk közötti reakció kinetikai vizsgálata. A Met esetében LC/MS, a Met-Enk esetében FOX módszert alkalmaztunk. A Leu-Enk-hidroperoxid fogyásával párhuzamosan a Leu-Enk monoxid illetve a Met-Enk-szulfoxid jelek intenzitásának növekedése volt megfigyelhető, hasonló sebességi állandóval. Pszeudo-elsőrendű kinetikai vizsgálatok megmutatták, hogy a Leu-Enk-OOH és a Met-Enk közötti reakció valóban másodrendű, mindkét komponens részrendűsége egy.^{C2}



2. séma Tyr-Met-dioxid képződésének javasolt mechanizmusa. A Tyr aminosav fenolgyűrűje peroxidáz-katalizált egyelektronos oxidációban fenoxil gyökké alakul, amiből szuperoxid addíciójával hidroperoxid köztiterméket ad. Ezután konjugált addíció játszódik le a Tyr-gyűrű és az amincsoport között és a Met tioéter csoportja szulfoxiddá oxidálódik intramolekuláris oxigéntranszfer révén. A reakciót az *orto*-hidroxil izomeren keresztül mutattuk be, hasonló útvonal írható fel a *para*-izomer képződésére.^{C2}

Több Tyr és Met aminosavat tartalmazó peptiden végzett kísérletekkel igazoltuk, hogy a reakcióút nem csak a Met-Enk esetében kedvezményezett (1. táblázat).

		A [M + H] ⁺ ion retenciós ideje	A dioxid retenciós ideje			
Aminosav szekvencia	Molekula tömeg			SOD nélkül µM	10μg/mL SOD μM	 Hidroperoxid (H₂O₂ ekvivalens μM-ban)
	g/mol	perc	perc			μΜ
YM	312,4	17,9	12,7; 14,0	$3,8 \pm 0,1$	$7,0\pm0,1$	$0,23 \pm 0,006$
MY	312,4	17,4	12,6; 14,7	$5,\!41 \pm 0,\!1$	$6,9\pm0,2$	<0,2
YGGFM	573,7	16,1	11,3; 12,5	$3,3 \pm 0,1$	$8,6\pm0,1$	<0,2
GYGGFM	630,7	13,3	10,2; 11,0	$8,0 \pm 0,4$	$10,5\pm0,4$	<0,2
Boc-YGGFM	673,8	14,1	9,6	$5,8 \pm 0,2$	$11,\!4\pm0,\!5$	<0,2
RFYVVM	814,0	8,4; 10,6	7,5; 9,6	$10{,}7\pm0{,}8$	$17,6\pm0,4$	<0,2
YSFKDMGLGR	1244,4	10,7	9,4	$1,0 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$	<0,2
MEVDPIGHLY	1173,4	18,6	12,3	$3,3 \pm 0,3$	$7,8\pm0,3$	<0,2
YM-S = O	361,1	15,93	13,53; 14,07	$2,55 \pm 0,09$	$4,15 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,002$

1. táblázat Dioxidképződés szempontjából vizsgált metionin tartalmú peptidek^{C2}

Dimer

Ha redukált glutation (GSH) jelenlétében generálunk Tyr fenoxil szabadgyököket *tormaperoxidáz* (HRP) és H₂O₂ segítségével, akkor a fenoxilgyökökkel való reakcióban GSH-tiil szabadgyök (GS•) képződik⁴⁰. A GS• és a feleslegben lévő GSH tiolát közötti kedvező reakció a glutation-diszulfid anion szabadgyök (GSSG^{•-}) képződését eredményezi (6. reakció), ami diffúzió kontrollált reakcióban reagál a vizes oldatban oldott oxigénnel GSSG-t és szuperoxidot eredményezve (7. reakció). GSH jelenlétében tehát nincs szükség a XO-ra a szuperoxid előállításához.

$$M^{n} + GSH \to M^{n-1} + GS^{\bullet}$$
⁽⁵⁾

$$GS^{-} + GS^{\bullet} \rightleftharpoons GSSG^{\bullet-}$$
(6)

$$GSSG^{\bullet-} + O_2 \to GSSG + O_2^{\bullet-}$$
(7)

Ebben a rendszerben az YG esetén bemutatva, képződik YG-OOH és YG-OH, de rövid élettartammal^{*C3*}. A szuperoxid addíciós út termékeinek fogyásával egyidejűleg egy új YG-OH tirozinjához konjugált GSH-nak megfelelő termék képződését tapasztaltuk (7. ábra).



7. ábra YG-hidroxid glutation adduktumainak LC/MS vizsgálata. (A) Az YG-hidroxid izomer 255 m/z értékű ionját és (B) az YG-OH GSH adduktjának m/z=562 értékű ionját követtük szelektív ion módban GSH hozzáadása nélkül (pontozott vonal) és 5 mM GSH jelenlétében (folytonos vonal). GSH kezelést követően az YG-hidroxid jele teljesen eltűnik a spektrumból (pontozott vonal). (C) YG-hidroxid GSH adduktjának fragmentációs spektruma. Az adduktum javasolt szerkezete a betét ábrán látható.^{C3}

Kísérleteink alapján a 8-9 reakcióknak megfelelő modellt javasoljuk a GSH-val konjugált peptid képződésére.



A modell szerint a Tyr-OOH-t a GSH a megfelelő Tyr-OH-származékká redukálja GSSG képződése közben (8. reakció). A képződő biciklusos Tyr-OH-származék Tyr nitrogénjének a gyűrűhöz való addíciójával egy erősen elektrofil α - β telítetlen konjugált kettős kötés képződik, amelyhez nukleofil addíciós reakcióban kötődik a GSH és/vagy egyéb Cys származékok tiolcsoportja (9. reakció). Kinetikai és oldategyensúlyi méréssorozatok segítségével igazoltuk, hogy a Cys nukleofil addíció egyensúlyi folyamat és ezért ennek megfelelően (egyensúlyi rendszerként kezelve) illesztettük a reakció kinetikai görbéit (8. ábra). A YG peptid származék GSH-val való reakcióját vizsgálva a két legjelentősebb Tyr-OH izomer (2.B. ábrán látható csúcsok 4 és 12 perces retenciós időknél) reakciójának időfüggését követtük tömegspektrometria segítségével. A mért másodrendű látszólagos sebességi állandók pH = 7,4-en $k_{4perc} = 11,8 \pm 0,7 \text{ M}^{-1}\text{perc}^{-1}$ és $k_{12perc} = 9,2 \pm 0,2 \text{ M}^{-1}\text{perc}^{-1}$ -nek adódtak. A nukleofil addíciós termék képződésére felírt egyensúlyi állandók mért értékei ilyen körülmények közt $K_{4perc} = (7,5 \pm 1,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ és $K_{12perc} = (21 \pm 4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.





8. ábra Az YG-hidroxid és glutation közötti addíciós reakció kinetikai vizsgálata. A reakciót az YG-hidroxid fogyásán keresztül követtük, tömegspektrometriával, szelektív ion módban. (A) A görbék az YG-hidroxid 4 perces retenciós idejű csúcsa (lásd. 2.B. ábra) alatti területének csökkenését mutatják az idő függvényében, 0.5 mM (\bullet), 1 mM (\triangle), 3 mM (\circ) és 5 mM (\blacktriangle) GSH jelenlétében. A folytonos vonalak a mért pontokra illesztett exponenciális görbéket jelölik. (B) A 9. reakcióhoz tartozó mért sebességi állandó értékek k' = k[GSH] változása a GSH koncentrációjának függvényében a 4 perc (\bullet , szaggatott vonal) és 12 perc (\circ , folytonos vonal) retenciós idejű YG-hidroxid izomerek esetén. Az adatok az (A) panelen láthatóakhoz hasonló exponenciális görbékből származnak. (C) A 9. reakcióhoz tartozó mért egyensúlyi állandó értékek K' = K[GSH] változása a GSH koncentrációjának függvényében. A jelölések a (B) panellel azonosak.^{C3}

Ezek az értékek azt sugallják, hogy sejten belüli GSH koncentrációk mellett (~5 mM) a reakció relatíve gyorsan (~15 perc felezési idővel) lejátszódik az egyensúlyt a nukleofil addíciós termék képződése felé eltolva (5mM GSH mellett a potenciálisan képződő Tyr-OH származékok ~95%-a konjugált formában található). Igazoltuk, hogy a reakció nemcsak glutationnal, hanem egyéb Cys-tiolokkal is lejátszódik, ami a fehérjékben nem ismeretlen Tyr-Cys keresztkötés⁴¹⁻⁴³ képződésének egy újfajta mechanizmusa lehet. Továbbá, az irodalomban sokat tanulmányozott 4-hidroxi-nonenalhoz (HNE) hasonlóan, a kisebb peptid-Tyr-OH-ok potenciálisan gátolhatják tiol-fehérjék funkcióit addíciós reakció útján (9. reakció). Igaz, hogy a GSH-val az addíciós reakció ~10-szer lassabb a HNE tipikus tiol addíciós reakcióihoz képest,⁴⁴⁻⁴⁶ de alacsony p*K*a-jú, aktív centrumban lévő reaktív Cys származékokkal ez a reakció a GSH-nál mért értékeknél nagyságrendekkel gyorsabb is lehet.

4.1.2 Stimulált humán neutrofilek, mieloperoxidáz enzimük segítségével, szuperoxid addíció útján oxidálják opioid peptidek tirozinjait

Az enkefalinok az endokrin és az idegrendszer fontos neurotranszmitterei/neurohormonjai. A leucin-enkefalin (Leu-Enk) és metionin-enkefalin (Met-Enk), YGGFL és YGGFM aminosav szekvenciával rendelkező opioid pentapeptidek, amelyek a morfinnal azonos receptorokhoz kötődve fejtik ki fájdalomcsillapító hatásukat^{47, 48}. A szervezetben mindenhol megtalálhatóak, de különösen fontos fájdalomcsökkentő szerepük van gyulladásos folyamatokban, ahol többek közt a fehérvérsejtek termelik őket⁴⁹⁻⁵². Mindkét peptidnek a fájdalomcsillapító hatásában nélkülözhetetlen az N-terminális Tyr aminosav, mert ezen keresztül kötődnek a receptoraikhoz⁵³. Elsődleges inaktiválódási/lebomlási mechanizmusuk is a Tyr vesztésen keresztül zajlik^{54, 55}. Ahogy azt az előző fejezetben ismertettem ezen peptidek Tyr-fenoxil szabadgyök-származékai effektíven reagálnak szuperoxiddal, ami a Tyr aminosav szerkezetét jelentősen módosítja 1. séma). Alapvető kérdés, hogy stimulált humán neutrofilek, az általuk generált szuperoxid, H₂O₂ és mieloperoxidáz (MPO) enzim segítségével, oxidálják-e az enkefalin származékok Tyr aminosav komponenseit.^{C4}

A neutrofil fagocita fehérvérsejtek a veleszületett immunitás alapelemei. Elsősorban fagocitózis útján pusztítják a betolakodó patogén mikroorganizmusokat és meghatározó szerepük van a gyulladásos folyamatokban is⁵⁶. Ezekben a folyamatokban kulcsszerep jut az általuk generált ROS-oknak^{6, 9}. A membránjukban található NADPH oxidáz (Nox 2) enzimkomplex, stimulus hatására nagy mennyiségű szuperoxidot generál a fagozómás és/vagy a sejten kívüli térben. A szuperoxid dizmutációjának következtében képződik H₂O₂, ami az azurofil granulumokban tárolt, de stimulus következtében szintén a fagozómás és sejten kívüli térbe kibocsájtott, MPO segítségével a jelenlévő (pszeudo)halogenideket (leginkább a Cl⁻, Br⁻, SCN⁻) (pszeudo)hipohalogénessavakká (HOCl, HOBr, HOSCN) oxidálja⁵⁷. Az MPO enzim reakcióinak kinetikája meglehetősen bonyolult (további részletek a 4.3.2 fejezetben olvashatók), de két alapvető kinetikai ciklust elkülöníthetünk: A már említett hipohalogéneket termelő halogenációs és a gyökös reakcióutakon végbemenő peroxidáz ciklusokat (3. séma).⁵⁸



3. séma A mieloperoxidáz enzim két összefüggő katalitikus ciklusa. Az ún. peroxidáz és halogenációs aktivitásokért egy- és kételektronos folyamatok sorozata felelős. A halogenációs ciklus első lépésében a H₂O₂, a natív Fe^{III}-at tartalmazó fehérjét Fe^{IV}-oxo szabadgyök kationná (Compound I) oxidálja egy kételektronos oxidációs lépésben. A

halogenációs ciklus záró lépésében a Compound I-es forma reagál a halogenidekkel vagy a tiocianáttal hipo(pszeudo)halogenitek képződése közben. A Compound I, megfelelő szubsztrát jelenlétében (pl Tyr) két egymást követő egyelektronos redoxireakciókban is redukálódhat szubsztrát szabadgyökök képződése közben. Ez utóbbi peroxidáz ciklus első egyelektronos lépésében köztitermékként képződik az ábrán látható Compound II-es enzimforma.^{C31}

A HRP-hez hasonlóan (3. reakció) az MPO peroxidáz ciklusa felelős a Tyr (és egyéb fenol származékok) egyelektronos oxidációjáért³⁶. Szemben a HRP szabadon hozzáférhető aktív centrumával az MPO hem-csoportja egy oldószertől elzártabb kötőzsebben helyezkedik el. Ennek ellenére azt találtuk, hogy az MPO -még fiziológiás mennyiségű kloridion jelenlétében is (ami a peroxidáz és halogenációs ciklusok versenyét eredményezi)-effektíven generál fenoxilgyököket nemcsak a szabad tirozinon és kisméretű dipeptidek tirozinjain, hanem az enkefalin és az endomorfin peptideken is (9. ábra).



9. ábra Tyr-tartalmú peptidek, mint peroxidáz-szubsztrátok összehasonlítása. A peptideket MPO és HRP enzimek szubsztrátjaiként alkalmaztuk, a reakciókat spektrofluorimetriásan követtük, a dimerképződésen keresztül. (A) A dimerképződés steady-state sebességeinek összehasonlítása (ld. betét ábra a (B) panelen). A kezdeti sebességek a Tyr-MPO reakcióban mért sebességekhez viszonyított relatív, %-ban megadott értékek. (B) Leu-Enk dimerizációjának reprezentatív kinetikai görbéje kloridionok távollétében és jelenlétében. Betét ábra: A kinetikai görbék lineáris szakasza. ^{C4}

Ha izolált humán neutrofilokat enkefalinok jelenlétében forbol-mirisztát-acetáttal (PMA) aktiváltunk, akkor a bekövetkező enkefalin oxidáció főtermékei a monoxid és a dioxid származékok voltak (10. ábra).



10. ábra Aktivált humán neutrofilok által termelt tirozintartalmú peptidek monoxidés dioxid származékainak detektálása LC/MS módszerrel. A PMA-val aktivált neutrofilok által oxidált 200 μ M (A) Leu-Enk, és (B) Met-Enk LC/MS kromatogramjai. A kromatogramok lentről fölfelé a natív peptidekhez illetve a mono- és dioxidszármazékokhoz tartoznak. A termékek mennyiségét a prekurzor ion mennyiségéhez képest számított relatív csúcs alatti területben fejeztük ki (olyan referencia rendszerben, ahol az MPO gátolt, így nincs reakció).^{C4}

Tömegspektrometriás szerkezetvizsgálataink rámutattak, hogy a Leu-Enk dioxid a biciklusos Tyr-OOH-származék, a monoxid pedig ennek a redukált Tyr-OH formája. A Met-Enk esetében a dioxid az előző fejezetben leírt 2. sémán bemutatott modell alapján képződő a Tyr-OH szulfoxid terméknek felel meg. Az enzimatikus reakciókkal ellentétben aktivált neutrofilok nagy mennyiségű Met-Enk monoxidot is generáltak, ami kizárólag a Met-szulfoxid származéknak felelt meg, és ahogy azt később látni fogjuk ez a rendszerben képződő HOCl Met-Enk-el való reakciójának a terméke. Összhangban az enzimatikus rendszerekkel a dioxidszármazékok keletkezéséhez elengedhetetlenül szükséges volt a neutrofilok aktiválása, aktív MPO jelenléte illetve H₂O₂ és szuperoxid is (11. ábra). SOD jelenlétében a dioxid képződése gátolt, ezért ditirozin nagyobb mennyiségben képződik az 1. reakciónak megfelelően, ahogyan azt az enzimatikus rendszernél is tapasztaltuk (lásd 1.A. ábra).



11. ábra Különböző kezelések hatása a (A) Leu-Enk és (B) Met-Enk oxidációs termékek képződése aktivált humán neutrofilok jelenlétében. A neutrofilokat PMA-val stimuláltuk, a reakciókat 30 perc után 20 µg/ml kataláz enzim hozzáadásával állítottuk le. A Met-Enk-dioxid, Met-Enk-szulfoxid, Leu-Enk-hidroperoxid és Leu-Enk monoxid termékek képződését LC-MS, a dimer termékekét spektrufluorimetriás módszerrel követtük. Az adatpontok és hibáik n = 3-4 független, különböző vérből mért eredmények átlaga és szórása. * $P \le 0.0001$, statisztikailag szignifikáns különböség a párosított t-teszt alapján.^{C4}

Mindezen észlelések fényében, összhangban az enzimatikus rendszereknél javasolt modellel (1. séma), a dioxidok képződése az MPO katalizálta enkefalin H₂O₂-dal való oxidációján keresztül a képződő Tyr-fenoxil szabadgyök és a NADPH oxidáz által generált szuperoxid addíciós reakciójában képződnek. A Met Enk esetén az intramolekuláris oxigén transzfer (2. séma) eredményeképp képződik a Met-Enk-Tyr-OH-Met-szulfoxid származék. A relatíve nagy mennyiségben képződő Met-Enk-szulfoxid képződése (a dioxiddal ellentétben) gátolt volt a HOCI-reaktív metionin vagy humán szérum albumin jelenlétében, ami alátámasztja, hogy ez a származék valószínűleg a HOCI általi Met oxidáción keresztül képződik (12. ábra).



12. ábra Aktivált neutrofil fagociták indukálta Met-Enk oxidációs reakciók javasolt modellje.

A termékek képződését a Met-Enk-koncentráció függvényében követve is jól látható, hogy a Met-Enk-dioxid és dimer képződések szuperoxid-függők (13.A,B. ábra). míg a Met-Enkszulfoxid képződés nem (13. C. ábra). Érdekesség, hogy alacsonyabb Met-Enk koncentrációknál szuperoxid jelenlétében egy trioxidszármazék is képződik (13.E. ábra). Tömegspektrometria és FOX analízis segítségével igazoltuk, hogy ez a Met-Enk-Tyr-OOH-Met-szulfoxid származék (14. ábra). Ennek a vegyületnek a képződése annak köszönhető, hogy a relatíve nagy mennyiségben termelt HOCl gyorsan oxidálja a jelen lévő Met-Enk tioéter csoportjait és (redukált metionint tartalmazó Met-Enk hiányában) az így képződő szulfoxid lesz az MPO elsődleges enkefalin szubsztrátja. A hidroperoxidcsoport hosszú élettartama itt azzal magyarázható, hogy mivel a Met-csoport a molekulában már oxidált formában van, az intramolekuláris oxigén transzfer reakció gátolt.



13. ábra Met-Enk neutrofilek által közvetített oxidációjának termékei a Met-Enk koncentrációjának függvényében. A Met-Enk koncentrációjának hatását vizsgáltuk az (A) dimer, (B) Met-Enk-dioxid, (C) Met-Enk-szulfoxid, (D) fennmaradó Met-Enk és (E) Met-Enk-trioxid termékekre, SOD enzim jelenlétében (\Box , szaggatott vonal) és távollétében (\circ , folytonos vonal). Az adatpontok n = 3 független, különböző vérből mért eredmény átlagát reprezentálják.^{C4}



14. ábra *Bal oldal:* Met-Enk-S=O hidroperoxid képződés vizsgálata az MPO/XO/acetaldehid rendszer hatására (A) LC/MS vagy (B) FOX módszerrel. *Jobb oldal:* Met-Enk-trioxid tömegspektrometriás vizsgálata. (A) fragmentációs spektrum, (B) fő fragmensek, (C) Met-Enk-trioxid feltételezett szerkezete. A peptid fragmensek elnevezése a Roepstorff-Fohlman nevezéktan alapján történt.^{C4}

A neutrofilok fontos gyulladást serkentő szerepük mellett, enkefalinok kibocsátásán keresztül, a gyulladásos fájdalom enyhítésében is részt vesznek^{49, 59}. Továbbá fiziológiai körülmények között az enkefalinok a neutrofilok aktiválásában is szerepet játszhatnak^{60, 61}. Mindezek fényében eredményeink azt sugallják, hogy a gyulladás helyszínén az aktivált neutrofilok által kibocsátott MPO és ROS a fenti reakcióutakon az enkefalinok Tyr és Met aminosav komponenseit oxidálhatják. A keletkezett enkefalin származékokban a Tyr aromás jellege és N-terminális amincsoportja elvész. Annak ellenére, hogy a Met oxidáció nem befolyásolja a Met-Enk fájdalomcsillapító hatását⁶², az N-terminális Tyr amincsoport alapfeltétele a receptorhoz való kötődéshez és az opioid hatás kifejtéséhez^{53, 62}, ezért feltételezhető, hogy ezen reakcióutak szerepet játszhatnak a neuroendokrin és az immunrendszer közötti kommunikációban.

4.1.3 Normál enzimműködés közben képződő fehérje-Tyr szabadgyökök reakciója szuperoxiddal

Több létfontosságú enzim, mint például a *ribonukleotid reduktáz* vagy a *ciklooxigenáz*, Tyr aminosav komponensén képződik fenoxil szabadgyök a katalitikus körfolyamat során, ezért a fenti eredmények fényében a szuperoxid ezen enzimek működését gátolhatja. Hogy enzimműködés közben képződő Tyr szabadgyök köztitermékekkel potenciálisan reagál-e a szuperoxid azt az *ámbrás cet mioglobin* modell fehérje segítségével kezdtük el vizsgálni. A mioglobinoknak (Mb) az aktív centrumában található hem-csoport Fe^{III}-at tartalmazó met-Mb származéka H₂O₂-dal való reakcióban egy ferril Mb (Fe^{IV}=O) származék képződése közben reagál. A reakció két elektron átmenetével jár, amiből az egyik a Fe^{III} --- Fe^{IV} átmenetre fordítódik a másik pedig elsősorban a fehérje Tyr103 és Trp14 aminosav komponenseit oxidálja^{63, 64}. Az ámbrás cet mioglobinjában, más Mb származékokkal ellentétben, van egy Tyr151 aminosav is, amelyen keresztül a fehérje az 1. reakcióhoz hasonlóan két Tyr összekapcsolásával dimerizálódik^{63, 65}. A (Tyr)₂ kötés képződhet két Tyr151 vagy egy Tyr151 és egy Tyr103 között ezért több fehérje is összekapcsolódhat oligomerek formájában. Az így képződő Mb-dimer képződésének gátlásán keresztül vizsgáltuk először az Mb-Tyr szabadgyök szuperoxiddal való reakcióját. A XO/acetaldehid rendszer 2-3 reakciók jelenlétében a XO által termelt H₂O₂ Mb-nal való reakciójában képződő Mb-Tyr szabadgyökök rekombinációja Mb dimerré csak SOD jelenlétében volt detektálható Western-blot (WB) analízis segítségével (15. ábra).



15. ábra Szuperoxid hatása a mioglobin dimerizációjára. (A) Gél-elektroforézis és Coomassie fehérje festés, valamint (B) denzitometriás analízis segítségével meghatároztuk 10 μ M mioglobin dimerizációjának a mértékét (10 μ M/min O₂^{•-} termelésnél) különböző SOD-koncentrációk mellett. Az adatpontok 3 független kísérletet reprezentálnak.^{C5}

Ez arra utal, hogy a Mb-Tyr-O^{•-} effektíven reagál a XO által termelt szuperoxiddal. A dimer képződést a kataláz enzim jelenléte gátolja, ami összhangban van azzal, hogy a Mb-Tyr-O^{•-} képződéséhez szükség van H₂O₂-ra (16. ábra).



16. ábra Mioglobin gátolt dimerizációja kataláz (A) vagy DMPO (B) és (C) jelenlétében. (A) és (B) Coomassie fehérje festés, (C) Western-blot DMPO-antitest segítségével.^{C5}

Megfelelő mennyiségű DMPO szabadgyökfogó jelenlétében a dimerizáció szintén gátolt volt és az anti-DMPO antitest segítségével végzett WB analízis rámutatott, hogy a hozzáadott SOD-koncentrációtól függetlenül mindig ugyanannyi Mb-Tyr-O^{•-} képződött (16. ábra), ami arra utal, hogy a SOD távollétében tapasztalt kisebb mértékű dimerizáció nem a Mb-Tyr-O^{•-} képződésének a gátlásával magyarázható. Elméletileg ugyanis a met-Mb szuperoxiddal való reakciója oxiMb képződését eredményezheti, és bár ez a reakció relatíve lassú, fontos volt meggyőződni arról, hogy ez nem befolyásolja a ferril-Mb képződést. Spektrofotometriásan igazoltuk, hogy a képződés sebességét sem befolyásolja a SOD jelenléte (17. ábra).



17. ábra Szuperoxid hatása a ferril-mioglobin képződésére. (A) Időfüggő spektrális változások a látható tartományban a Mb/XO/acetaldehid rendszerben (10 μ M/min O₂^{•-} termelésnél). (B) A ferrilMb koncentrációja az idő függvényében SOD enzim jelenlétében (•) és távollétében (•) (10 μ M/min O₂^{•-} termelésnél). Az adatpontok és hibasávok három párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják.^{C5}

A XO/AA/Mb reakcióelegyekből izolált fehérjék tripszines emésztését követő, általunk beállított kvantitatív tömegspektrometriás analízis, az irodalmi adatokkal összhangban, azt mutatta, hogy azoknak a peptideknek csökkent a kontrollhoz viszonyított koncentrációja, amelyek tartalmazzák a peroxid hatására oxidálódó aminosavakat (Trp14, Tyr103 és Tyr 151). Tovább csökkent a Tyr151-et tartalmazó peptid (T24; Glu148-Gly153) koncentrációja, de nem változott a Trp14-et vagy Tyr103-at tartalmazó peptideké SOD hozzáadására, összhangban azzal, hogy a dimerizáció a Tyr151-en keresztül történik (18. ábra).



18. ábra Szuperoxid hatása a T24 (ELGYQG) triptikus peptid visszanyerésére. A T24 peptid mennyiségét a XO távollétében mért értékhez képest százalékos arányban adjuk meg. A T24 peptid csúcs alatti területeit belső standardok segítségével normáltuk. Az oszlopok és hibasávok három párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják.^{C5}

Az a tény, hogy szuperoxid jelenlétében kevesebb intakt T24 fogyott arra utal, hogy a dimerizációt a szuperoxid (legalább részben) elektrontranszfer reakció útján (1. séma 2. reakció) gátolja. Tripszines emésztést követően tömegspektrometria segítségével vizsgáltuk, hogy az addíciós reakcióút (1. séma 3. reakció) lejátszódik-e ebben a rendszerben. A peptidek közül csak a T24-nek az oxidatív módosulata volt számottevő mennyiségben detektálható két T24+16Da izomer formájában. A T24 peptidet szintetikus úton is előállítottuk és a 2-3. reakciónak megfelelő rendszernek (XO/AA/HRP) kitéve. A kapott azonos retenciós idők és fragmentációs spektrumok alapján igazoltuk, hogy a fehérje emésztése után kapott T24+16 peptid a szuperoxid Tyr151 szabadgyökhöz való addícióját követő redukció útján képződik (19. ábra).



19. ábra *Bal oldal:* **Mioglobin T24 triptikus peptidnek és monoxidjának detektálása.** (A) LC/MS kromatogramok a natív $([M + H]^+)$ és a monoxid $([M + 16 + H]^+)$ T24 peptid származékok detektálására SOD jelenlétében (szaggatott vonal) és távollétében (fekete

vonal), XO/acetaldehid-del kezelt rekombináns Mb triptikus emésztése után. A kromatogram a TIC-ből lett az egyszeresen töltött részecskék tömeg/töltés értékeire szűrve. (B) és (C) rendre a monoxidszármazék és a natív peptid fragmentációs spektrumai. (D) Peptid fragmensek jelölése a Roepstorff-Fohlman nevezéktan szerint. *Jobb oldal:* **Peroxid-és az azt követő monoxidképződés a célzottan szintetizált ELGYQG peptiden.** (A) LC/MS kromatogramok a natív ($[M + H]^+$) és a dioxid ($[M + 32 + H]^+$) peptid származékok detektálására a XO/acetaldehid/HRP-al kezelt, szintetikusan előállított ELGYQG esetén. (B) Az A minta éjszakai állás hatására az Mb rendszerben detektált monoxidszármazékká bomlik (szaggatott vonal). (C) Az A ábrán látható dioxidszármazék fragmentációs spektruma, ami arra utal, hogy ez a Tyt-peroxid-származék.^{C5}

Ezzel összhangban, a T24+16 peptid koncentrációja a SOD koncentráció növelésével csökkent (20. ábra).



20. ábra Szuperoxid hatása a T24+16 (ELGYQG) triptikus peptid adduktum képződésére. Az oszlopok és hibasávok három párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják.^{C5}

Fenil-izotiocianát kromofor hozzákapcsolását követő csatolt UV-látható spektrofotometria és tömegspektrometria segítségével végzett, általunk kifejlesztett kvantitatív analízis alapján az Mb-Tyr-O^{•–} szuperoxiddal való reakciója 10-szer nagyobb gyakorisággal játszódik le az elektrontranszfer reakcióúton (1. séma 2. reakció) az addícióhoz képest (1. sáma 3. reakció). Az előző fejezetben javasolt modellel összhangban az addíciós reakcióút hozzájárulása (i.e. a T24+16 peptid koncentrációja) szabad amincsoportokat tartalmazó Lys hozzáadására dózisfüggően nőtt (21. ábra).



21. ábra Lizin hatása a T24+16 (ELGYQG) triptikus peptid adduktum képződésére. Az oszlopok és hibasávok három párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatják. ^{C5}

Továbbá igazoltuk, hogy az ELGYQG peptid esetén a szuperoxid által módosított Tyr+16 aminosav is effektíven reagál GSH-val (9. reakció és 22. ábra).



22. ábra ELGYQG Tyr-hidroxid GSH adduktumának LC/MS jellemzése. A peptidet a HRP/XO rendszerrel reagáltattuk, majd inkubáltuk GSH távollétében (A) illetve jelenlétében (B). A hidroxid és a GSH adduktum jeleit SRM módban követtük LC/MS/MS módszerrel. Az eredmények az (A) spektrumban látható legnagyobb intenzitású csúcshoz képest számított relatív értékek. Az (A) esetben nem detektáltuk a GSH adduktum képződését, míg a (B) esetben nem láthatók a peptid-hidroxid jelei. (C) A GSH adduktum fragmentációs spektruma. (a ° vízvesztést jelöl). (D) az ELGYQG-OH-GSH adduktum javasolt szerkezete és fragmentációs mechanizmusa a Roepstorff-Fohlman nevezéktan szerint.^{C3}

Ennek ellenére, a szuperoxiddal módosított Tyr151-et tartalmazó globuláris Mb esetében, GSH-val történő inkubációt követő tripszines emésztés után, csak nyomokban tudtuk a T24+16 GSH adduktját detektálni. Ennek az volt az oka, hogy az emésztést acetonos kicsapás utáni visszaoldás előzte meg, amely a maradék GSH-t eltávolította a rendszerből és a 9. reakcióban szemléltetett egyensúlyt a GSH addukt reaktánsokká való szétesése felé tolta el. Ezt elkerülendő, a 23. ábrán látható eredmények azt mutatják, hogy a szintetikusan előállított T24 peptid GSH adduktumján a módosított Tyr151 karbonilcsoportjának Na[BH4]-os redukciója megvédte azt a széteséstől a GSH eltávolítása után.



23. ábra *Bal oldal:* Redukált ELGYQG triptikus peptid glutation adduktumának LC/MS detektálása. (A) A Na[BH₄]-tal redukált GSH adduktum LC/MS/MS jelei SRM módban (folytonos vonal). A csúcsok intenzitását a legnagyobb csúcsintenzitással normáltuk. A nem redukált GSH adduktum jelenléte nem volt detektálható (szaggatott vonal). (B) A redukált GSH adduktum fragmentációs spektruma. (C) A redukált ELGYQG-GSH adduktum javasolt szerkezete a fragmentumok feltüntetésével. *Jobb oldal:* Na[BH4] hatása az adduktum disszociációjának időbeli lefolyására. A GSH adduktum fogyása Na[BH4]redukálószer távollétében (•) és jelenlétében (•). (A) a GSH adduktumot Na[BH4]-tal redukáltuk vagy nem kezeltük, majd jodoacetamiddal reagáltattuk. A redukált és nem-redukált adduktum LC/MS módszerrel követtük SRM módban. A reakcióindítás időpontjában mért adduktum mennyiségét 100%-nak vettük a kiértékelés során. (B) A redukált és a nem redukált hidroxid prekurzor követésével SRM módban megállapítottuk,

hogy állás hatására a monoxidszármazék képződése (i.e. a GSH addukt szétesése) csak a nem redukált mintában volt mérhető (•). A 900 perc elteltével mért hidroxid mennyiséget 100%-nak tekintettük. ^{C3}

Ezzel összhangban, ha a szuperoxid addícióval módosított Mb-t a GSH-val való inkubációt követően Na[BH4]-tal redukáltuk, akkor emésztés után a T24+16 peptid teljes egészében a GSH addukt formájába volt detektálható (24. ábra).



24. ábra Redukált T24-hidroxid mioglobin triptikus peptid glutation adduktumának LC/MS detektálása. Mioglobint XO rendszerrel reagáltattuk GSH kezelés nélkül (A) vagy amellett (B), majd Na[BH₄]-tal redukáltuk. Mindkét mintát triptikus emésztésnek vetettük alá és LC/MS módszerrel analizáltuk. A folytonos vonalak a redukált GSH adduktumot jelölik, a pontozott vonalak pedig a hidroxid forma jeleit. A relatív jelintenzitásokat a legmagasabb csúcs intenzitásához képest adjuk meg.^{C3}

Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a Tyr-fenoxil gyök köztitermék képződésével járó enzimatikus reakciók (*ciklooxigenáz, ribonukleotid reduktáz*) szuperoxid jelenlétében nagy valószínűséggel gátoltak. A szuperoxid inhibíció történhet 1) reverzibilisen a Tyr szabadgyökök regenerálásával (elektrontranszfer reakció) vagy 2) irreverzibilisen hidroperoxidszármazék képződésén keresztül (addíciós reakció). Hogy melyik reakcióút a kedvezőbb, azt a környező aminosavak funkciós csoportjai fogják leginkább befolyásolni. Példának okáért eredményeink arra utalnak, hogy az oldalláncban amin csoportot tartalmazó aminosavak (Lys) valószínűsíthetően az addíciós reakcióútnak kedveznek. Az addíciós úton képződő Tyr-OOH származék GSH-val effektíven redukálható. A képződő Tyr-OH származékban található konjugált kettős kötésen keresztül további elektrofil addíciós reakcióban a módosított Tyr aminosav reverzibilisen glutationilálódik. Ez kémiailag különbözik az irodalomban sokat taglalt S-glutationilációtól, amelyek diszulfid hidakon keresztül a Cys tiolok specifikus reakciói és egy potenciálisan új glutationilációs mechanizmusra hívják fel a figyelmet. Annak, hogy proteomikai tanulmányokban ezt a fajta Tyr-glutationilációt nem tartják számon, az lehet a

legvalószínűbb oka, hogy az addíciós reakció (más biológiailag jelentős elektrofil ágensekkel ellentétben) reverzibilis, ezért az a hagyományos emésztési folyamat közben elbomlik.

4.1.4 Oxidatív stressz hatására képződő fehérje-Tyr szabadgyökök és szuperoxid reakciója

Sugárhatás vagy gyulladás okozta oxidatív stressz következtében nagy mennyiségben képződnek fehérje hidroperoxidszármazékok biológiai rendszerekben⁶⁶. A hidroperoxid funkciós csoportok pozíciója és keletkezésük molekuláris mechanizmusai azonban csak részben ismeretesek. Fehérjék, sugárhatás vagy enzimatikus úton történő, egyelektronos oxidációja nemcsak direkt reakcióban generál Tyr-fenoxil gyököket, hanem az intramolekuláris elektrontranszfer folyamatok következtében akkor is kedvezményezett képződésük, ha az oxidáció nem közvetlenül a Tyr aminosavakon történik⁶⁶. Feltettük tehát a kérdést, hogy az általunk javasolt szuperoxid addíciós reakcióút hozzájárulhat-e az oxidatív stressz hatására tapasztalt fehérjekárosodások kialakulásához.

Inzulint mint modell fehérjét alkalmazva vizsgáltuk, hogy sugárhatás vagy enzimatikus úton generált szabadgyök transzfer útján végbemennek-e az 1. sémán bemutatott modellben javasolt reakciók. Az inzulinnak 4 Tyr aminosav komponense van az α lánc 14-es és 18-as és a β lánc 16-os és 25-ös pozícióiban. Impulzus radiolízis segítségével N₂O-dal telített inzulin oldatokban N₃ jelenlétében a 2. táblázatban feltüntetett 10-13. reakciókon keresztül sikerült Tyr-fenoxil szabadgyököket generálni a fehérjén. Mikroszekundumos időskálán felvett UV-látható spektroszkópia és dozimetria segítségével bemutattuk, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények között a fehérjén generált szabadgyökök túlnyomórészt a tirozinokra koncentrálódnak (25. ábra).



25. ábra Inzulin Tyr gyökök generálása impulzus radiolízis módszerrel. A gyökök képződését és fogyását az időben UV-látható fotometria segítségével követtük, 120 Gy dózisnál N₂O-dal telített oldatban. A 10 μ s-nál mért spektrum hasonló a tirozin gyökök
jellemző spektrumához, amelyben az elnyelési maximum 405 nm-nél található és 385-390 nm között látható benne egy oldalsáv.^{C6}

Szuperoxid távollétében az inzulin-Tyr-O^{•–} lassú rekombinációját mutatja a 26.A. ábrán látható N₂O-dal jelzett kinetikai görbe. Ha az inzulint tartalmazó oldatok oxigénnel telítettek, akkor a jól dokumentált kinetikai paraméterek alapján (2. táblázatban látható modell) kiszámolható, hogy körülbelül 1:1 arányban kell inzulin-Tyr-O^{•–} és szuperoxid képződjön.



26. ábra Az inzulin-Tyr szabadgyök és a szuperoxid közötti reakció kinetikája. (A) Inzulin-Tyr szabadgyök bomlásának 405 nm-en rögzített kinetikai görbéje szuperoxid jelenlétében (oxigénnel telített) és távollétében (N₂O-dal telített oldatban). A gyökök fogyása az utóbbi esetben sokkal lassabb, mint ekvimoláris mennyiségű szuperoxid jelenlétében. Oxigénnel telített oldatban 100 μ M SOD inhibiálja a reakciót. (B) A szuperoxid és az inzulin Tyr gyökök közötti reakció látszólagos másodrendű sebességi állandója a reaktánsok koncentrációjának széles tartományában vizsgálva hasonló értékűnek adódott.^{C6}

Ilyen körülmények között az inzulin-Tyr-O^{•–} élettartama (26.A. ábrán látható O₂-vel jelzett kinetikai görbe) lényegesen rövidebb volt és a kinetikai görbék gyors reakciót leíró kezdeti szakaszai másodlagos kinetikai egyenlettel jól illeszthetőek voltak. A különböző koncentrációk mellett (dózisfüggés) mért másodrendű sebességi állandók jó egyezést mutattak (26.B. ábra), ami arra utal, hogy a kinetikai görbék nagy valószínűséggel a feltételezett bimolekuláris reakcióhoz rendelhetők. A kapott látszólagos másodrendű sebességi állandók átlaga $k = (6 \pm 1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a szabad Tyr-nál mértnek körülbelül a fele, ami arra utal, hogy reakció fehérjék esetében is nagyon gyors. Az irodalomban leírt lehetséges reakcióutakat figyelembe véve egy összetett kinetikai modellt javasoltunk (2. táblázat).

Reakció	Sebességi állandó	Sorszám	
H ₂ O \implies 0,28 e^- + 0,28 HO [•] + 0,28 H ⁺ + 0,055 H [•] + 0,04 H ₂ + 0,07 H ₂ O ₂		(10)	
$e^- + N_2O + H_2O \rightarrow HO^{\bullet} + N_2 + OH^-$	$k_8 = 9,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(11)	
$HO^{\bullet} + N_3^- \rightarrow N_3^{\bullet} + OH^-$	$k_9 = 1,4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(12)	
$Inzulin-TyrOH + N_3^{\bullet} \rightarrow inzulin-TyrO^{\bullet} + N_3^{-} + H^+$	$k_{10} = 5,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(13)	
Inzulin-SS + $e^- \rightarrow$ inzulin-SS ^{•-}	$k_{11} = 1,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(14)	
Inzulin-SS + H^{\bullet} + OH^{-} \rightarrow inzulin-SS $^{\bullet-}$ + H_2O	$k_{12} = 1,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(15)	
$e^- + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet-}$	$k_{13} = 1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(16)	
Inzulin-TyrO• + inzulin-TyrO• \rightarrow inzulin dimer	$k_{14} < 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(17)	
Inzulin-TyrO• + O_2 •- \rightarrow termékek	$k_{15} = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(18)	
$N_3^{\bullet} + N_3^{\bullet} \rightarrow 3N_2$	$k_{16} = 3.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(19)	
$H^{\bullet} + O_2 \longrightarrow HO_2^{\bullet}$	$k_{17} = 1,2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(20)	
Inzulin-SS ^{•-} + $O_2 \rightarrow inzulin-SS + O_2^{\bullet-}$	$k_{18} = 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(21)	
$N_3^{\bullet} + O_2^{\bullet-} \longrightarrow N_3^- + O_2$	$k_{19} = 1,2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(22)	
$\mathrm{H}^{+} + \mathrm{O_2}^{\bullet-} \leftrightarrow \mathrm{HO_2}^{\bullet}$		(23)	

2. táblázat A kinetikai görbék szimulációjához használt kinetikai modell.

A modell alapján szimulált kinetikai görbék (amiket a differenciál-egyenleteket numerikusan megoldva számoltunk a Runge-Kutta módszert alkalmazva) jól illeszkedtek a mért kinetikai görbékhez (27. ábra), ami arra utal, hogy a modell összhangban van a kísérleti eredményekkel.



27. ábra Inzulin-Tyr gyökök bomlása. Az inzulin-Tyr gyökök képződésének és fogyásának mért (pontok) és szimulált (folytonos vonal) kinetikai görbéje. A szimulációt a 2. táblázatban bemutatott kinetikai modell alapján végeztük.^{*C6*}

Gél-elektroforézis és intakt fehérje tömegspektrometria segítségével igazoltuk, hogy a sugárhatásnak kitett inzulin dimerizálódik, ami szuperoxid jelenlétében gátolt (28. ábra).



28. ábra Inzulin dimerizációjának vizsgálata (A) gél-elektroforézis és (B) intakt fehérje LC/MS segítségével. N₂O-dal telített oldatban (szuperoxid nélkül) több dimer képződik, mint oxigénnel telített oldatban (szuperoxid jelenlétében). A hibasávok három párhuzamos kísérlet szórását mutatják.^{C6}

Az inzulin-Tyr-O^{•-}-t enzimatikus úton is sikerült előállítani HRP-peroxid és szabad Tyr jelenlétében. A szabad Tyr-re azért volt szükség, mert az inzulin nem szubsztrátja a HRP-nek, de a szabad Tyr igen és a képződő Tyr-O^{•-}-val való reakcióban sikerült inzulin-Tyr-O^{•-}-t előállítani. Ezt bizonyítja, hogy ilyen körülmények között intakt fehérjetömegspektrometriás eljárással sikerült a fehérje dimert és a monomerhez illetve dimerhez egy vagy két szabad Tyr kötődését is detektálni (3. táblázat). A táblázat arra is utal, hogy Tyr-fenoxil gyök az inzulin 4 tirozinjából legalább hármon képződik. Amikor a reakcióelegyben szuperoxidot is generáltunk a XO/AA enzimatikus rendszer segítségével (2-3. reakció), akkor a Tyr keresztkötések eltűntek és helyettük inzulin-monoxid és inzulindioxid származékok képződtek. A dioxid utalhat egy hidroperoxid- vagy két hidroxidcsoport jelenlétére.

Reakció rendszer ^a	Termék tömege	Termék	Relatív mennyiség % (±SD) ^b
HRP és H ₂ O ₂			
1. minta: inzulin + HRP + H ₂ O ₂	5826	Inzulin	100
2. minta: inzulin + HRP + Tyr + H_2O_2	5826,4	Inzulin	100
	+5824	Dimer	0,8 (0,2)
	+6002,7	Dimer + Tyr	6,7 (0,4)
	+6181,5	Dimer + 2Tyr	1,3 (0,1)
	+178,6	+Tyr	6,7 (0,2)
	+357,5	+2Tyr	1,4 (0,2)
	+14,4	+O	0,9 (0,2)
HRP és XO/AA			
3. minta: inzulin + HRP + Tyr + XO/AA	5826.4	Inzulin	100
	+32	+20	1,9 (0,1)
	+15,9	+O	1,6 (0,2)
4. minta: 3. minta + SOD^c	5826,5	Inzulin	100
	+5824	Dimer	1,2 (0,3)
	+6001,6	Dimer + Tyr	1,5 (0,3)
	+179,1	+Tyr	3,9 (0,5)
5. minta: 3. minta + GSH ^d	5826,5	Inzulin	100
	+630	+O + 2GSH	1,3 (0,2)

3. táblázat Inzulinból enzimatikus rendszerek hatására képződött, tömegspektrometriásan azonosított termékek.

A használt inzulin aszpart teoretikus tömege: 5826.

^aKísérleti körülmények Das és társszerzői 2014-es közleményében^{C6}

^bTermék mennyisége %-osan megadva a megmaradó nem módosított inzulinhoz képest amit 100%-nak vettünk (n = 3).

^c+20 μ g/ml SOD.

^d + 5mM GSH, reakció idő = 16 h, t = 37 °C.

Az impulzus radiolízissel besugárzott mintákat V8 proteázzal való emésztés után nano-HPLC-hez csatolt nagy érzékenységű és pontos tömeg meghatározásra alkalmas Orbitrap készülékkel vizsgáltuk. A N₂O-dal telített (itt nem képződik szuperoxid csak inzulin-Tyr-O^{•–}) mintákban sikerült azonosítani a két Tyr14-en keresztül összekötött di peptidet (29. ábra), ami szuperoxid jelenlétében (oxigénnel telített oldatokban) nem volt detektálható. Ez volt az egyetlen Tyr-Tyr kötést tartalmazó peptid, amit találtunk.



29. ábra Két Inzulin A2 peptid Tyr14-es aminosavak által összekapcsolt dimerjének fragmentációs spektruma a megfelelő jelhozzárendelésekkel. A dimer peptid tartalmazza a Tyr14-Tyr14 keresztkötést. (A) A besugárzott, N₂O-dal telített inzulin oldat spektruma redukálást, alkilálást és V8 proteázzal történő emésztést követően. (B) Peptid fragmensek jelölése az (A) spektrumból a Roepstorff-Fohlman nevezéktan segítségével. ^{C6}

Ezzel összhangban az emésztés utáni tömegspektrometriás analízis igazolta, hogy az enzimatikus úton generált inzulin-monoxid a Tyr14-hidroxid-származék és mivel másik tirozinon nem sikerült oxidációt igazolni, és a hidroperoxidszármazékok az emésztés alatt hidroxiddá redukálódnak, valószínűsíthető, hogy az intakt fehérjeanalízisnél detektált inzulin-dioxid a Tyr14-OOH származéknak felel meg. Azt tapasztaltuk, hogy ha az inzulin-Tyr-OOH képződést követően azonnal adtunk GSH-t a reakcióelegyhez, akkor a Tyr14-OH-hoz 1 vagy két GSH is kötődhet (30. ábra).





30. ábra Az Inzulin A2 peptidjéből szuperoxid addíciójával és glutation konjugációjával képződő termékek LC/MS detektálása. Inzulin kezelése HRP/XO rendszerrel, (A) GSH kezelés nélkül és (B,C) GSH kezelést követően. A mintákat V8 proteázzal emésztettük. A pontozott vonalak a monoxid formát jelölik (A,B,C), a folytonos vonalak pedig az egy (A,B) vagy két (C) addícionált glutationt tartalmazó formákat jelölik. Az eredményeket relatív gyakoriság értékben adtuk meg, a legnagyobb intenzitású csúcshoz képest.^{C6}

Abban az esetben viszont, ha a GSH-val csak másnap kevertük össze az inzulin szuperoxid addícióval módosított termékeit, akkor csak az 1 GSH-t kötő Tyr14-OH származék volt detektálható, de nagyobb mennyiségben. Ez arra utal, hogy a nem N-terminális tirozint tartalmazó peptidekben a biciklusos Tyr származék képződését eredményező gyűrűzáródási lépés (1. séma 5. reakció) lassabb/összemérhető lehet a GSH addíció sebességével. Ezért a para helyzetben történő szuperoxid addíció gyűrűzárás előtti köztitermékéhez akár két glutation is kapcsolódhat a 4. sémán látható modell szerint.



4. séma Tyr szabadgyökök és szuperoxid közötti reakció javasolt mechanizmusa. Szuperoxid távollétében a Tyr gyökök kovalens Tyr-Tyr keresztkötéseket képeznek (1). A Tyr gyökök a szuperoxiddal vagy elektrontranszfer (2a) vagy addíciós (2b) reakcióba

lépnek. Az elektrontranszfer hatására a Tyr visszatermelődik, az addíció hidroperoxidszármazékot eredményez. A hidroperoxid forma nukelofil ágensek (Nu) jelenlétében monoxiddá redukálódhat (3). A monoxid forma már nem rendelkezik aromás karakterrel, azonban tartalmaz két elektrofil kettős kötést, amelyekkel két GSH molekulát képes addícionálni Michael-addíciós reakcióban (4). Egy alternatív útvonalon a Tyr amid nitrogén konjugált addícióba léphet a fenolgyűrűvel (5), amely során biciklusos monoxid termék képződik, így csak egy molekula glutation képes addícionálódni (6).^{C6}

Eredményeink rámutatnak, hogy sugárhatás vagy aktivált neutrofilok által (az általuk kibocsájtott MPO által oxidált szabad Tyr-en keresztüli fehérje oxidációval) generált oxidatív stressz hatására, egyelektronos reakció utakon, képződik fehérjéket összekötő Tyr-Tyr keresztkötés. Szuperoxid jelenlétében a fehérje Tyr-fenoxil szabadgyökök szuperoxiddal való reakciói gyorsak és preferáltak. A szuperoxid addíciós reakcióiban képződő hidroperoxidok lehetnek másodlagos toxikus termékek, hiszen ezek nemcsak a fehérjék inaktivációjához/degradációjához vezethetnek, hanem oxidálhatnak létfontosságú biomolekulákat (pl. DNS bázisokat, vagy fehérje tiolokat⁶⁶⁻⁶⁸) is.

4.1.5 ApoAl fehérje koleszterin szállító funkciójának gátlása sugárterápia hatására

Daganatos betegek sugárterápiás gyógykezelésének mellékhatásaként jelentkezhet kardiovaszkuláris betegségek, köztük ateroszklerózis vagy érszűkület kialakulása. Aterómák keletkezésének a megakadályozásában a nagy sűrűségű lipoproteineknek (HDL) fontos szerep jut, mert védik az artéria falát többek közt a makrofág habsejtekből való koleszterin eltávolításával. Ennek egyik domináns mechanizmusa a *zsírszegény apolipoprotein A-I* (ApoA-I) által segített, a makrofágok membránjában található ABCA1 transzporteren keresztüli koleszterin eltávolítás (31. ábra).



31. ábra Az ApoA1 fehérje foszfolipid és koleszterin szállításának mechanizmusa makrofágokból az ABCA1 transzporteren keresztül.⁶⁹

Az ApoA-I-ben 7 Tyr és 3 Met található (32. ábra), melyek oxidációja gátolja a fehérje biológiai funkcióit.



32. ábra Az ApoA1 fehérje egykristály röntgendiffrakciós szerkezete. A 7 Tyr zöldpiros-kék szférikus jelöléssel, a 3 Met pedig sárga szférikus jelöléssel van kiemelve a pálcika modellből.

A Washingtoni Egyetem radiológiai onkológia tanszékén a betegek sugárkezelésére használt besugárzó berendezések segítségével vizsgáltuk, hogy rekombináns ApoA-I, N₂O-dal vagy oxigénnel telített, vizes oldataiban tapasztalunk-e Tyr vagy Met oxidációt. A mintákat SDS-PAGE gél-elektroforézissel vizsgálva a sugárhatás következtében az ApoA-I dimerizációja/oligomerizációja volt megfigyelhető, ami a szuperoxid jelenlétében gátolt volt. GSH hozzáadására szuperoxid jelenlétében a monomer fehérje egy része nagyobb molekulatömegnek megfelelő mobilitás irányába tolódott, ami módosított tirozinok glutationilációjára utal.



33. ábra Az ApoA1 fehérje sugárhatás következtében detektált oligomerizációja gátolt szuperoxid jelenlétében. Besugárzás hatására a 10 µM ApoA1 30 mM azidot tartalmazó,

N₂O-dal telített 50 mM foszfát puffer oldatokban oligomerizálódik. A 2. táblázatban bemutatott modell szerint ilyen közegben az azid gyökök szelektíven támadják a Tyr és Trp aminosav komponenseket, ezért az oligomerizáció nagy valószínűséggel a Tyr szabadgyökök rekombinációjának a következménye. Oxigénnel telített oldatban szuperoxid is keletkezik, mely gátolja az oligmerizációt és a GSH jelenlétében a monomerek kissé nagyobb molekulasúly felé való eltolódása jelzi a szuperoxid addíciós termékek glutationilációját. Az SDS-PAGE gél-elektroforézissel elválasztott fehérje száramzékokat Coomassie kékkel festettük. A besugárzást a betegek gyógyítására használt lineáris gyorsító segítségével végeztük. A teljes leadott dózist (200 Gy) 5 Gy/perc besugárzási sebességgel értük el.

Ezekkel összhangban a minták tömegspektrometriás analízise azt mutatta, hogy a dimerizáció elsősorban a leginkább redoxiérzékeny Tyr192 aminosavon keresztül játszódik le. A N₂O-dal telített mintákban a (Tyr)₂ képződés gyakoribb volt, ezekben a mintákban a Tyr192 keresztkötése a Tyr236-ot kivéve az összes többi Tyr-nal kimutatható volt (34.D. ábra).



34. ábra ApoA1 aminosav komponensek oxidációja besugárzás hatására. A Tyr (A), Met (B) és Trp (C) aminosavak oxidált formáinak %-os előfordulása a nem oxidált formához képest besugárzás hatására szuperoxid távollétében (N₂O) és jelenlétében (O₂) illetve a nem besugárzott mintákban (kontroll). (D) A Tyr192-höz diTyr keresztkötéssel kötött Tyr aminosavakat tartalmazó peptid dimerek %-os előfordulása az intakt Tyr-t tratalmazó formához képest. A besugárzást a betegek gyógyítására használt lineáris gyorsító segítségével végeztük. A teljes leadott dózist (200 Gy) 5Gy/perc besugárzási sebességgel értük el. A peptideket a fehérje triptikus emésztése után nano-LC/MS módszerrel detektáltuk.

Szuperoxid jelenlétében az összes tirozinon detektálható volt Tyr-OH képződés, a Tyr18 és Tyr192 oxidációja volt a legkedvezményezettebb (34.A. ábra). Ez összhangban van korábbi tanulmányokkal, melyek szerint a Tyr192 az ApoA-I leginkább oxidatív érzékeny tirozinja ⁶⁹. Tirozin oxidáció HDL besugárzása során is megfigyelhető volt, de sokkal kisebb mértékben, ami arra utal, hogy a komplexben az ApoA-I védettebb (35. ábra).



35. ábra HDL-ben kötött ApoA1 Tyr aminosav komponenseinek oxidációja besugárzás hatására szuperoxid távollétében (N2O) és jelenlétében (O2). 0,5 mg/ml HDL, 30 mM azidot tartalmazó N2O-dal vagy oxigénnel telített 50 mM foszfát pufferes oldatának besugárzása. Az ábrán feltüntetett értékek az intakt Tyr-t tartalmazó peptidekhez képest %-ban vannak megadva. A besugárzást a betegek gyógyítására használt lineáris gyorsító segítségével végeztük. A teljes leadott dózist (200 Gy) 5 Gy/perc besugárzási sebességgel értük el. A peptideket a fehérje triptikus emésztése után nano-LC/MS módszerrel detektáltuk.

Jól ismert, hogy a Tyr192 oxidációja gátolja a fehérje koleszterin transzportban betöltött funkcióját⁶⁹. Ezzel összhangban azt találtuk, hogy a Tyr oxidáció mértékének megfelelően ABCA1-gyel transzfektált BHK sejtekben vizsgálva, a besugárzásnak kitett rekombináns ApoA-I koleszterin efflux aktivitása gátolt (36.A. ábra). Az oxidáltsági fokkal összhangban ez a hatás nem vagy sokkal kisebb mértékben jelentkezett a HDL esetén.



36. ábra Besugárzás hatása ApoA1 (A) és HDL-ben kötött ApoA1 (B) koleszterin szállító képességére. A 34 és 35 ábrákkal összhangban a kevésbé oxidálódott HDL-ben kötött ApoA1 koleszterinszállító képessége kevésbé sérült mint a szabad ApoA1-é, besugárzás következtében Tyr oxidáció hatására. ³[H] izotóppal jelzett koleszterin

szállítását ABCA1-gyel transzfektált BHK sejtekben mértük a Shao és társszerzői 2010-ben megjelent cikkben⁶⁹ leírtak alapján.

Kísérleteink rávilágítottak arra, hogy sugárterápia hatására sérülhet az ApoA1 fehérje koleszterin és foszfolipid szállító képessége, ami hozzájárulhat a sugárterápia okozta érrendszeri megbetegedések kialakulásához.

4.2 Cisztein tiolok redoxibiokémiája^{C7-C25, B1, B2}

4.2.1 A cisztein tiolok reaktivitásának rövid bemutatása

A cisztein a fehérjék egyik legritkább aminosav komponense, ami elsősorban a többi aminosavhoz képest kimagasló reaktivitásával magyarázható. Erélyes redukáló tulajdonságát az oldalláncán található tiolcsoportjának köszönheti, melyben a kén, elektron konfigurációját (1s)²)(2s²)(2p⁶)(3s²)(3p⁴) figyelembe véve, a legalacsonyabb -2-es oxidációs számmal szerepel. A kénatom "lágy" karakterének köszönhetően a Cys tiolok nagyon jó nukleofil ágensek, ami fontos tényezője könnyű oxidálhatóságuknak. A Cys tiol biológiai rendszerekben detektált legoxidáltabb *szulfonsav* származékában (CySO₃H) a kén oxidációs száma +4. A két extrém állapot között, köztes oxidáltsági fokú Cys származékok széles skálája található, ami fémjelzi a cisztein tiolok rendkívül gazdag redoxikémiáját. A biológiai rendszerekben leggyakrabban leírt cisztein származékokat a 37. ábra összegzi, kénatomjaik oxidáltsági állapotát feltüntetve.



37. ábra Cys aminosav különböző oxidáltsági állapotú származékai^{C9}

A Cys tiolok elsőszámú célpontjai nem csak lezárt héjú oxidálószereknek, hanem szabadgyököknek is, amelyekkel reagálva reakciókaszkádokon keresztül az adott körülmények függvényében képződhetnek az 5. sémán látható származékok.



5. séma Cys aminosavak biológiai rendszerekben előforduló egy- és kételektronos oxidációs kaszkádjai. (X=Cl, Br, SCN, OH)^{B2}.

A Cys aminosavak ritka előfordulásuk mellett a nagy reaktivitásuknak köszönhetik a fehérjék alapvető fontosságú funkcióiban betöltött szerepeiket is. Létfontosságú szerepet töltenek be például a fehérjék másodlagos szerkezetének kialakulásában, a frissen készült polipeptid láncok diszulfid hidakon keresztüli összekapcsolásával és stabilizálásával^{C10}. Ezek a folyamatok szigorúan elkülönítve (eukarióta sejtek esetén az endoplazmikus retikulumban (ER) és a mitokondriális membránon belüli térben (IMS), prokariótáknál pedig

a periplazmában), jól összehangolt enzimkaszkádok által vezérelt kinetikai kontroll alatt zajlanak, elsősorban tiol-diszulfid cserereakciók mentén. A fehérjeszerkezet stabilizálásában betöltött statikus szerepükön túl, dinamikus redukciós-oxidációs reakcióik révén, redoxiaktív fehérjék aktív centrumának vezérlői is. Ezek közül az értekezésem középpontjában az oxidatív stressz elleni védelemben és a sejten belüli jelátviteli folyamatok redoxivezérlésében betöltött szerepeik vannak. Mindkét folyamat ROS-okkal való redoxireakciókon keresztül zajlik, amik biológiai rendszerekben szigorú termodinamikai és kinetikai kontroll alatt állnak. A termodinamikai kontrollt elsősorban a sejten belüli redoxihomeosztázis fenntartásáért felelős millimólos koncentrációban jelen lévő glutation redukált/oxidált aránya jelenti. Ez a sejt különböző kompartmentjeiben eltérő. Példának okáért, míg a citoszolban nagyon redukáló atmoszféra uralkodik addig az ER-ban a fehérjék diszulfid hídjainak kialakulása miatt oxidálóbb környezetre van szükség. A termodinamikai kontroll kizárólag azt hivatott szabályozni, hogy melyek a potenciálisan végbemehető biológiai folyamatok. A sejtek dinamikus természetéből kifolyólag azonban azt, hogy valójában melyik redoxireakció fog lejátszódni - az irodalomban sokáig uralkodó dogma ellenére^{70, 71} - nem a redoxipotenciálok viszonya szabja meg, hanem az egyes reakciók egymáshoz viszonyított sebessége. Ebben a kinetikai kontrollban természetesen főszerep jut az enzimkatalízisnek. Nem meglepő tehát, hogy a fehérjék Cys tioljainak reaktivitása nagyon széles skálán mozog, amit számos paraméter befolyásol. Ezek közül legfontosabbak a tiol csoport pK_a értéke, a sztérikus gátlás, Coulomb és H-híd kölcsönhatások szomszédos funkciós csoportokkal, a reakciók inter- vagy intramolekuláris jellege, illetve a fehérjeszerkezetből adódó mechanikai hatások. A kinetikai kontroll szerepét és a tiolok reaktivitásáért felelős paramétereket kinetikai és mechanisztikus megközelítésből a 2013ban megjelent összefoglaló cikkben^{C10} részleteztem biológiai példákon szemléltetve. Kimagasló jelentősége és az irodalomban található gyakori félreértelmezések miatt, a tiol pKa-val kapcsolatban néhány probléma külön is kiemelendő:

 Több protonált funkciós csoportot tartalmazó molekulák esetén a tiol csoport deprotonálódásának jellemzésére (ami a kinetikai viselkedést a leginkább befolyásoló paraméter) a mikroszkópikus savi disszociációs állandókat kell alkalmazni, mert a makroszkópikus savi disszociációs állandók a molekula teljes protonáltsági fokára utalnak (6. séma).

46



6. séma Redukált glutation makroszkópikus (A) és mikroszkopikus (B) részecskeeloszlása pH>5 esetén, és a megfelelő makroszkopikus és mikroszkopikus egyensúlyi állandók.^{C10}

2) A fehérjék tiolcsoportjainak savi disszociációs állandói nem statikus paraméterek. Mivel a fehérjék fluktuációja/működése következtében másodlagos/harmadlagos/negyedleges szerkezeteik állandóan változnak, ezért a tiol csoportjaikat körülvevő egyéb funkciós csoportok pozícióinak és hatásainak változásával a tiol p K_a -k is nagymértékben változhatnak.

3) Gyakori félreértelmezés az irodalomban, hogy annál reaktívabb egy Cys tiol, minél kisebb a p K_a -ja. Ez abból a megfigyelésből adódik, hogy a redoxireakcióik leggyakrabban elektrofil-nukleofil reakciók, ahol a tiolcsoport deprotonált tiolát formája sokkal erősebb nukleofil ágens a protonált formához képest. Ez a hatás azonban csak p K_a > 7 ciszteinek esetén növeli a reaktivitást, mert ez alatt, pH = 7-en, a p K_a csökkenése nem jár a reaktívabb tiolát forma koncentrációjának növekedésével. A Brönsted-egyenlet értelmében a tiolát forma nukleofilicitása a p K_a -val csökken:

$$\log k^{17} = -1,29 + \beta_{\rm nuc} p K_{\rm a}^{\rm RSH}$$
(24)

Ez egy ellentétes p K_a effektusnak felel meg, ezért pH = 7-en, a p $K_a < 7$ tiolok esetén a reaktivitás a p K_a -val csökken (38. ábra).



38. ábra Tiol-GSSG reakciók Brönsted-egyenlet alapján számított k_{app}^{1} sebességi állandója a tiol pK_a-jának függvényében, pH = 7 esetén.^{C10}

4.2.2 Az oxidáló ágensek

A fehérje Cys oxidációs folyamatokat nem csak a tiol reaktivitása szabja meg; fontos szerepe van az oxidáló ágens kémiai tulajdonságainak is. Doktori értekezésem számos a ciszteinek HOX-val (X = Cl, Br, SCN) és H₂O₂-dal való reakcióira vonatkozó eredményeket mutat be. A H₂O₂, mint a szuperoxid dizmutációjának terméke, képződik a mitokondriális sejtlégzés és egyéb autooxidációs reakciók melléktermékeként, de fontos másodlagos terméke a Nox enzimcsaládnak is (lásd 4.1.1 fejezet). Ezért a H₂O₂, a szuperoxidhoz hasonlóan, nemcsak oxidatív stresszt okozó toxikus ROS, hanem meghatározó szerep jut neki a redoxivezérelt jelátviteli folyamatokban is⁷². Ez utóbbi szerepe kiemelkedő figyelmet kap a modern redoxibiológiában. Mára már konszenzus alakult ki az irodalomban a tekintetben, hogy a H₂O₂ ciszteinnel való oxidációs reakciói reguláló szerepet töltenek be a sejt működésében (további részletek a 4.2.5 fejezetben).

Ezzel szemben a HOX-származékok elsősorban hem-peroxidáz enzimek H₂O₂-ból, leginkább a betolakodó patogén organizmusokat roncsoló/pusztító célzattal generált termékei⁶. Mindezen biológiai funkcióik összefüggésbe hozhatók kémiai tulajdonságaikkal B2,73 . A H₂O₂ standard redukciós potenciáljából adódóan erősebb oxidálószernek minősül, mint a HOCl (és a HOBr)⁷⁴. Továbbá, savi disszociációs állandóikat figyelembe véve a Nernst-egyenlet segítségével, semleges pH-n számolt redoxipotenciáljaik tekintetében a H₂O₂ (1,37 V) szintén erélyesebb oxidálószernek bizonyul a HOCl/OCl⁻ elegynél (1,25 V). Ennek fényében meglepő lehet az, hogy biológiai rendszerekben a HOX sokkal roncsolóbb hatású, amit reakcióinak kevésbé specifikus jellege okoz^{B1}. Ez azzal magyarázható, hogy bár a H₂O₂ termodinamikailag erélyesebb oxidálószer, a hipohalogénes savak reakcióik kisebb aktivációs energiái miatt kinetikailag reaktívabbak. Ennek a tulajdonságnak köszönhetően a hipohalogénessavak nemcsak ciszteinekkel, hanem más fehérje funkciós csoportokkal (lásd pl a HOCl, cisztin-amin csoportokkal való reakcióit később) is nagyon kedvező, gyors reakciókban reagálnak, míg a H₂O₂ az aminosav komponensek közül elsősorban cisztein tiolokat támad.

A HOX-származékok egymáshoz képest is eltérő kémiai és biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. A megfelelő redoxipárok részletes vizsgálata rámutatott, hogy a nyál- (SPO) illetve laktoperoxidáz (LPO) enzimek csak HOSCN-at képesek termelni, míg az eozinofil fehérvérsejtek eozinofil-peroxidáz enzime (EPO) HOSCN mellett HOBr-at is termel⁷⁴. A peroxidázok közül egyedül a neutrofil fagociták (melyek leginkább mikroorganizmusok fagocitózis útján történő elpusztítására specifikusak) mieloperoxidáz (MPO) enzime képes HOCl-at termelni. A HOCl szerepe nem csak baktériumölő immunreakciókban, hanem a gyulladásos folyamatok mellékhatásaiként kialakuló betegségekben is széles körben igazolt/tanulmányozott^{56, 75}. A H₂O₂-ból a MPO termelhet HOCl-at, HOBr-at és HOSCN-at is, melyeknek különböző biológiai jelentősége van. Azt hogy melyik oxidálószer keletkezik, többek között a (pszeudo)halogenid biológiai koncentrációja határozza meg (3. séma halogenációs ciklus). Munkánk arra is rámutatott, hogy az enzimreakciótól függetlenül, a SCN⁻-nal való nagyon gyors közvetlen reakcióik révén (HOBr esetén majdnem diffúzió kontrollált $k_{app}^{PH7} = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$) az enzimatikusan termelt HOCl és HOBr nagy hatékonysággal alakulhat át HOSCN-tá^{C11,76}. ¹⁵N, ¹³C NMR, UV-látható spektroszkópia és ionkromatográfiás módszerek segítségével igazoltuk, hogy az LPO enzim által termelt oxidált SCN- származék valóban OSCN- és nem ONCS-, SOCNvagy OCNS⁻ molekulaszerkezettel rendelkezik^{C12}. Továbbá egy eddig nem közölt elnyelési maximumot találtunk ($\lambda = 376$ nm) a molekula UV-látható spektrumában. Ez a csúcs jól elkülönül a reakcióelegyben található egyéb anyagok elnyeléseitől, ezért a közölt moláris abszorbancia ($\epsilon^{376nm} = 26.5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) bizonyos esetekben lehetőséget nyújt a molekula koncentrációjának az eddigi módszereknél pontosabb, közvetlen mérésére (39. ábra).



39. ábra A hipotiocianit szerkezete és néhány spektroszkópiai tulajdonsága.

Részletes kinetikai vizsgálatokat végeztünk a HOSCN — SCN⁻⁻ reakciórendszerben^{C13}. A kinetikai analízis egyik jelentősége, hogy lehetőséget teremtett a HOX reaktivitásainak összevetésére egyazon reakciópartnerrel (SCN⁻) lejátszódó reakcióiban, amire az irodalomban korábban nem volt példa. Méréseink arra utalnak, hogy a (pszeudo)hipohalogénessavak elektrofilicitási sorrendje: HOBr > HOCl >> HOSCN, ami magyarázatul szolgálhat a HOSCN biológiai mintákban észlelt hosszabb élettartamára. (A HOX-ak, megfelelő X⁻-nal való szinproporciós reakciói az X⁻-ionok nukleofilicitásait figyelembe véve ezt alátámasztják^{C13}).

A HOSCN bomlását ¹⁵N, ¹³C NMR spektroszkópia, ionkromatográfia, UV-látható spektroszkópia és kinetikai módszerekkel vizsgálva sikerült azonosítanunk a tiokarbamát S-oxidot (H₂NC(=O)SO⁻), mint a hidrolízis termékét, ami az irodalomból korábban nem ismert vegyület^{C14}:



7. séma Hipotiocianit hidrolízisének javasolt mechanizmusa és terméke.^{C14}

Az H₂NC(=O)SO⁻ semleges pH-n ammóniumion, hidrogén-karbonát-ion és elemi kén képződését eredményezve lassan ($k = (3, 2 \pm 2) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) hidrolizál:

$$H_2NC(=O)SOH + H_2O \rightarrow NH_4^+ + HCO_3^- + S \downarrow$$
(25)

Cys jelenlétében azonban diszulfidokat képez az alábbi reakcióúton, ami fiziológiás jelentőséget adhat a molekulának:

$$H_2NC(=O)SOH + CySH \rightarrow H_2NC(=O)SSCy + H_2O$$
(26)

$$H_2NC(=O)SSCy + CySH \rightarrow H_2NC(=O)SH + CySSCy$$
 (27)

4.2.3 Cisztein reakciói (pszeudo) hipohalogénessavakkal

A cisztein aminosav HOCl-val való reakciója nagyon gyors^{C8}. ¹H-NMR spektroszkópia segítségével tisztáztuk, hogy nagy Cys felesleg mellett a reakció végterméke széles pH tartományban CySSCy. A Cys:HOX arány emelésével megjelentek a nagyobb oxidációs számú ként tartalmazó CySO₂H és CySO₃H származékok is. Cáfoltuk azonban, hogy a reakcióban hosszú élettartamú szulfenil-klorid származék képződik. Igazoltuk, hogy a szulfenil-kloridnak hitt köztitermék valójában a reakcióelegyek tökéletlen keverésének köszönhetően megváltozott koncentrációarányok miatt képződő cisztin-diklóramin molekula volt. Ez a származék a CySSCy HOCl-val való reakciójával képződik (lásd később).

Stopped-flow módszerrel szisztematikusan vizsgáltuk a HOCl és Cys aminosav reakcióinak kinetikáját. A sebességi egyenlet koncentráció- és pH-függésének analízisével igazoltuk, hogy a protonált HOCl forma 4 nagyságrenddel gyorsabban reagál, mint a deprotonált OCl⁻ ($k_{HOCl} = 1,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{OCl}^{-} = 1,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Megkíséreltük megmérni a Cys reakcióinak sebességét HOBr-val illetve OBr⁻-nal is, de a HOBr lényegesen nagyobb savi disszociációs állandója miatt a reakció sebessége még 14-es pH-n (1 M koncentrációjú NaOH-ban) is túl gyors ahhoz, hogy *stopped-flow* módszerrel mérhető legyen. Ez az eredmény arra utal, hogy a HOBr és a Cys reakció sebessége közelít a diffúziókontrollált küszöbhöz.

Részletesen tanulmányoztuk a HOSCN GSH-nal és a nagy moláris abszorbanciájú modell tiol 5-tio-2-nitrobenzoesavval (TNB) való reakcióinak a kinetikáját is, Ismereteink szerint ez volt az első a HOSCN tiol-specifikus reakcióira vonatkozó kinetikai tanulmány. A TNB HOSCN-val való reakciójának harang alakú pH-függését, termékanalízist, a TNB savi disszociációs állandóinak meghatározását, a polikromatikusan gyűjtött adatok SVD analízisét és a sebességi egyenlet koncentrációfüggéseinek vizsgálatát követően a 28-32. reakciókkal leírt modell alapján levezetett 33. egyenlettel illesztettük (40. ábra).

$$TNB - SH^{-} \rightleftharpoons TNB - S^{2-} + H^{+} \qquad \qquad K_{a}^{TNB}(SH) \qquad (28)$$

$$H^+ + OSCN^- \rightleftharpoons HOSCN$$
 $\frac{1}{K_a^{HOSCN}}$ (29)

$$HOSCN + TNB - S^{2-} \xrightarrow{k_{10}} TNB - S - SCN^{-} + OH^{-}$$
(30)

$$HOSCN + TNB - SH^{-} \xrightarrow{k_{13}} TNB - S - SCN^{-} + H_2O$$
(31)

$$TNB - S - SCN^{-} + TNB - S^{2-} \xrightarrow{gyors} DTNB^{2-} + SCN^{-}$$
(32)

Azokkal a feltételezésekkel élve, miszerint a 28. és 29. reakciók gyors előegyensúlynak tekinthetők és a 32. reakció relatíve gyors, a 33. egyenletnek megfelelő sebességi egyenlet vezethető le a 28-32. reakciókkal leírt modell alapján.

$$\frac{-d[OSCN^{-}]}{dt} = \left(k_{10}K_{a}^{TNB}(SH) + k_{13}[H^{+}]\right) \times$$

$$\frac{1}{\left(K_{a}^{HOSNC} + [H^{+}]\right)} \frac{1}{\left(K_{a}^{TNB}(SH) + [H^{+}]\right)} \times$$

$$[HOSCN]_{tot}[TNB]_{tot}[H^{+}]$$
(33)

A 28-33. egyenleteket a Nagy és társszerzői 2009-es közlemény^{C15} tartalmazza.



40. ábra A pH hatása a HOSCN/OSCN⁻ és TNB közötti reakció sebességére. (A) A mért pszeudo-elsőrendű sebességi állandók változása a hidrogénion-koncentráció függvényében pH>6.5 esetén és a pontokra illesztett egyenes. (B) *Felső panel*: A reakció sebességének pH profilja. A folytonos vonalat az adatpontok 33. egyenlettel való illesztésével nyertük. *Alsó panel*: Számított részecskeeloszlás a pH függvényében. Jelölések: OSCN⁻ (folytonos vonal), HOSCN (rövid szaggatott vonal), a TNB teljesen deprotonált (szaggatott vonal), egyszeresen protonált (pontozott vonal) és teljesen protonált (hosszú szaggatott vonal) formái.^{C15}

A javasolt modell szerint a reakció széles pH tartományban (2,5 < pH < 8) kizárólag a HOSCN protonált formán keresztül zajlik. A TNB és a GSH HOSCN-val való bimolekuláris reakcióinak mért másodrendű sebességi állandói meglepően nagy értékek voltak: $k_{\text{TNB}} = 1,26 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $k_{\text{GSH}} = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és közel estek a HOCl és Cys közötti reakció állandójához (1,2 × 10⁹ M⁻¹s⁻¹). Tehát a HOSCN pH = 7,4-en mért nagyságrendekkel lassabb reakciója tiolokkal ($k_{\text{GSH}}^{\text{pH7.4}} = 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) a HOSCN HOClhoz és HOBr-hoz képest lényegesen kisebb savi disszociációs állandójából adódik. A pHfüggés illesztéséből újra meghatároztuk a HOSCN savi disszociációs állandóját: p $K_a^{\text{HOSCN}} =$ 4,85 ± 0,01, ami az irodalmi p $K_a^{\text{HOSCN}} = 5,3$ -as ⁷⁷ értéktől jelentős eltérést mutat. Véleményünk szerint az eltérés a korábbi munkában alkalmazott módszerek korlátaira vezethető vissza.

Ahogy már említettem, a HOCl és HOBr roncsoló biológiai hatásait elsősorban nem specifikus reakcióiknak tulajdonítják. A HOSCN biológiai szerepére vonatkozó eredmények irodalma korlátozott. Ennek ellenére ismeretes, hogy a HOCl és HOBr-nél sokkal kevésbé erélyes oxidálószer, és a fehérje aminosav komponensek közül a cisztein tiolokkal specifikusan reagál. Érintőleges vizsgálatokon nyugvó irodalmi adatok arra utaltak, hogy a

HOSCN kevésbé toxikus emlős sejtekre, mint a HOCl és HOBr. Ezt enyhébb reaktivitásával és tiol-specificitásával magyarázták⁷⁸. Érdekes azonban megemlíteni, hogy endotél sejtekkel végzett kísérleteink arra utalnak, hogy a HOSCN a HOCl-val és a HOBr-val ellentétben, gátolja a programozott sejthalált (apoptózist) a kaszpáz enzimek inaktiválásán keresztül (a kaszpázok tiolcsoportjainak reverzibilis oxidációjával 41. és 42. ábra)^{C16}. Ennek a biológiai jelentőségét még vizsgálni kell, de ez a megfigyelés utalhat arra, hogy a HOSCN specifikus tiolcsoportokat támadó tulajdonsága okozhat kóros elváltozásokat is a természetes sejthalál gátlásának következtében felhalmozódó sérült sejteknek köszönhetően.



41. ábra A HOSCN kaszpáz aktivitást csökkentő hatása in vitro kísérletekben. A lizátumok olyan sejtekből készültek, amelyeket előzőleg 7 órán át kezeltünk szérummentes médiummal az apoptózis kiváltására. Ezeket a lizátumokat a megadott mennyiségű HOSCNel kezeltük 1 percig, majd meghatároztuk a kaszpáz aktivitást DTT távollétében és jelenlétében. Az eredményeket %-os értékben fejeztük ki, a 100% a kezeletlen lizátumhoz tartozik. Üres oszlopok: 0 mM DTT, sávozott oszlopok: 5 mM DTT (n=3).^{C16}



42. ábra Kis mennyiségű HOSCN apoptózist gátló hatása HUVEC sejtekben. A sejteket 5 órán át kezeltük szérummentes médiumban (SFM) a megadott koncentrációjú hipotiocianittal, majd felszedés után (A) meghatároztuk a kaszpáz 3 aktivitásukat DEVD-AMC segítségével vagy (B) SDS-PAGE és Western-blot módszerekkel analizáltuk őket

kaszpáz 3 ellenes antitestekkel. (A nyíl a hasított kaszpáz 3 sávját jelzi; negatív kontroll (ve), kezeletlen sejtek; pozitív kontroll, apoptózis indukálására SFM-ben inkubált sejtek, n=3). Annak meghatározására, hogy a HOSCN képes-e gátolni a kaszpáz 3-at apoptózis indukálása után, HUVEC sejteket 5 órán át kezeltünk szérummentes médiummal majd ezt követően 2 órán át HOSCN-val (másodlagos kezelés). Felszedés után (C) meghatároztuk a kaszpáz 3 aktivitásukat DEVD-AMC segítségével vagy (D) vizsgáltuk a kaszpáz 3 hasadási fokát. Az SFM-mel előzetesen kezelt sejteknél (+ve) tapasztaltuk a kaszpáz 3 hasadását, de a HOSCN másodlagos kezelésnek kitett sejtek esetében nem. Az (A) és (C) esetben az eredmények és a hibasávok 4 párhumazos mérés átlagait illetve szórásait mutatják. * $P \le 0,05$ statisztikailag szignifikáns különbség.^{C16}

4.2.4 Oxidált Cys-származékok másodlagos reakciói.

A HOX Cys-nel való reakcióinak kinetikai vizsgálatai során a bimolekuláris direkt reakciókat két jól detektálható elkülönülő reakció követte (a 43. ábra betétjében látható egy tipikus kinetikai görbe). A 12 > pH tartományban a lassabb reakció sebessége független volt a pH-tól, a gyorsabb reakció pedig savkatalizált (43. ábra). Mindkét reakció detektálható volt függetlenül attól, hogy HOBr-at vagy HOCl-at használtunk primer oxidálószerként. Összetett kinetikai és termékanalízis eredményeképp sikerült megállapítani, hogy a pH-független reakció a cisztin tioszulfinát-észter származék (CyS(=O)SCy) (38. reakció) a savkatalizált reakció pedig a cisztein szulfénsav (CySOH) Cys-nel való reakciója (37. reakció). Minden mérési adatunkkal összhangban lévő modell javaslatunk alapján a CySOH, a Cys HOX-val való reakciójában (34. reakció) képződő szulfenil-halogenid (CySX) származék pillanatszerű hidrolízisével képződik (35. reakció), a CyS(=O)SCy pedig két CySOH kondenzációjának a terméke (36. reakció).

$$CySH + HOX \rightarrow CySX + H_2O$$
(34)

 $CySX + H_2O \rightarrow CySOH + H^+ + X^-$ (35)

$$CySOH + CySOH \rightarrow CyS(=O)SCy + H_2O$$
(36)

$$CySOH + CySH \rightarrow CySSCy + H_2O$$
(37)

$$CyS(=O)SCy + CySH \rightarrow CySOH + CySSCy$$
(38)



43. ábra A CySH és HOX közötti reakciót követő két reakció pH függése; X=Cl (\circ) és X=Br (\Box). A pH-függő folyamat, amely a teljes 10-14 pH tartományban megfigyelhető, a 37. reakcióhoz tartozik. A pH-független reakció, amely csak pH=12 alatt megy végbe, a 38. reakcióhoz rendelhető. A vízszintes vonal megmutatja, hogy a lassabb reakció esetén pH=12 alatt mért pontok nem esnek egy vonalba a pH=12 fölött megfigyelhető pH-független reakcióval. *Betét ábra*: pH=11,21 esetén mért kinetikai görbe, λ =268 nm. A görbe szemlélteti a gyorsabb, pH-függő, és a lassabb, pH-független reakciókat.^{C8}

A CyS(=O)SCy köztiterméket szintetikus úton is előállítottuk, szerkezetét NMR spektroszkópia segítségével igazoltuk. A szintetikusan előállított CyS(=O)SCy savi disszociációs állandóit UV-látható és NMR spektroszkópiás titrálások segítségével meghatároztuk^{C7} (44. ábra).



44. ábra CyS(=**O**)**SCy savi disszociációs állandójának meghatározása** (A) UV-látható fotometriás, (B) NMR spektroszkópiai módszerrel. (A) CyS(=O)SCy fényelnyelésének változása a pH függvényében 228 és 260 (Betét ábra) nm-en ($^{\circ}$), és az egy szabad paraméterrel illesztett görbe (folytonos vonal). Az ebből számított pK_a 7.62±0.05. (B) CyS(=O)SCy ¹H-NMR titrálási görbéi, amelyek az egyik β-protonhoz tartozó dupla dublett jelcsoport kémiai eltolódásainak változását mutatják a pH függvényében. Az ebből számított pK_a értéke 7,62±0,01.^{C7}

Ezen állandók ismeretében részletesen vizsgáltuk a CyS(=O)SCy hidrolízisének és Cys-el való reakcióijának a kinetikáját széles pH tartományban. Igazoltuk, hogy a HOX Cys-el való reakcióelegyében mért pH-független reakció valóban a CyS(=O)SCy Cys-el való reakciója. pH < 10 esetében a CyS(=O)SCy aminosavainak protonálódása miatt a Cys-t oxidáló reakciójának (38. reakció) sebessége is változik a pH-val.



45. ábra A pH hatása a CyS(=O)SCy és a CySH közötti reakció kinetikájára. (A) A kinetikai görbéket 268 nm-en mértük és pH=12 alatt exponenciális görbével illesztettük. pH 12 fölött 300 nm-en végeztük a méréseket és kettős exponenciális függvényt illesztettünk a görbékre. Az így kapott egyik exponenciális görbe pH-függetlennek bizonyult (\circ és vastag vonal), a másik függvényből kapott sebességi állandó a pH csökkenésével nőtt (x). A kb. pH=12-nél látható pont, amelyet körrel és kereszttel is jelöltünk, egy exponenciális illesztésből származó érték, de minden bizonnyal a két függvény kompozíciója. *Felső panel*: A k_{eff} értékeket a $k_{1b} = 4,7(2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{1b'} = 5,7(6) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{1b'''} = 3,6(7) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{1b'''} = 4,6(3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -hez tartozó (folytonos vékony vonalakkal szimulálva) vagy a kombinált $k_{1b} + k_{1b''} + k_{1b'''}$ -hez tartozó (a mért adatpontokra illeszkedő folytonos vastag vonallal szimulálva) reakcióutak alapján levezetett sebességi egyenletek alapján számoltuk. A sebességi állandók a 8. sémán definiált reakcióutakhoz tartoznak. Az adatpontokat 18 °C-on mértük. A mért k_{eff} értékek mellett (\circ és x) hibavonalként azok szórását is feltüntettük. *Középső panel*: CyS⁻ és CyS²⁻ részecskék számított eloszlása p $K_{a2s}^{CySH} = 8,5$; $pK_{a2n}^{CySH} = 8,9$; $pK_{a3n}^{CySH} = 10,0$ és $pK_{a3n}^{CySH} = 10,4$ esetén. A jelzett pont, amelyben [CyS⁻] = [CyS²⁻], a pK_{a3n}^{CySH} . *Alsó panel*: A CyS(=O)SCy⁰, CyS(=O)SCy⁻ és CyS(=O)SCy² részecskék számított eloszlása $pK_{a3}^{eszter} = 7,3$ és $pK_{a4}^{eszter} = 7,9$ esetén. (B) A cisztein mikroszkópikus savi disszociációs állandóinak definiciói.^{C8,C9}

A mért adatpontokat a 8. sémán található modell alapján levezetett sebességi egyenlettel illesztve a CyS(=O)SCy különböző protonált formáinak Cys tiolát származékaival való reakcióinak másodrendű sebességi állandóit meghatároztuk.

CySH⁰
$$\Rightarrow$$
 CyS⁻ + H⁺ $pK_{a2s}^{CySH} = 8,5$ CySH⁻ \Rightarrow CyS²⁻ + H⁺ $pK_{a3s}^{CySH} = 10,0$ CyS(=0)SCy⁰ \Rightarrow CyS(=0)SCy⁻ + H⁺ $pK_{a3s}^{észter} = 7,32$ CyS(=0)SCy⁻ \Rightarrow CyS(=0)SCy²⁻ + H⁺ $pK_{a4}^{észter} = 7,92$ 1b CyS(=0)SCy⁰ + CyS⁻ \rightarrow termékek $k_{1b} = 4,7(2) \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 1b'CyS(=0)SCy⁻ + CyS⁻ \rightarrow termékek $k_{1b'} = 5,7(6) \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 1b''CyS(=0)SCy²⁻ + CyS⁻ \rightarrow termékek $k_{1b''} = 3,6(7) \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$ 1b'''CyS(=0)SCy²⁻ + CyS²⁻ \rightarrow termékek $k_{1b''} = 4,6(3) \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$

8. séma A Cys(=O)SCy Cys-el való reakciójának javasolt modellje.

A mért pH függés és a javasolt modellünk összhangban volt a CyS(=O)SCy hidrolízisének kinetikai viselkedésével (46. ábra), ahol a mért pszeudo-elsőrendű sebességi állandók pH függése szintén minimum 3 különböző protonált formán keresztül lejátszódó modell segítségével volt jól illeszthető (9. séma).



46. ábra CyS(=O)SCy hidrolízisének megfigyelt sebességi állandói (\circ). Betét ábra: a CyS(=O)SCy különböző protonáltsági fokú formáinak számított eloszlása a pH függvényében p $K_{a1} = 7,32$ és p $K_{a2} = 7,92$ esetén. A polikromatikus adatokat 218 és 400 nm között gyűjtöttük. Az adatokat a teljes spektrum szinguláris érték felbontás (SVD) analízise segítségével illesztettük. Az illesztések a 9. sémában szereplő két K_a modell segítségével készültek, az ábra a p $K_{a1} = pK_{a2} = 7,62$ (folytonos vonal) és a p $K_{a1} = 7,32$ és p $K_{a2} = 7,92$ (pontozott-szaggatott vonal) eseteket szemlélteti. Az egy K_a modell alapján történő rossz illeszkedést a szaggatott vonal mutatja.^{C7}

Egy K_a Modell:

 $K_{a3} = \frac{[CyS(=O)SCy^{-}][H^{+}]}{[CyS(=O)SCy^{0}]}$ $CyS(=O)SCy^0 \rightleftharpoons CyS(=O)SCy^- + H^+$ $CyS(=O)SCy^0 + OH^- \rightarrow termékek$ k_0 $CyS(=O)SCy^- + OH^- \rightarrow termékek$ k_1 $\text{Reakciósebesség} = \frac{-d[\text{CyS}(=\text{O})\text{SCy}]_{\text{tot}}}{dt} = \left(P_0 \cdot k_0 \left[\text{H}^+\right] + P_1 \cdot k_1 K_{a3}\right) \frac{[\text{OH}^-]}{[\text{H}^+] + K_{a3}}$ Két Ka Model: $K_{a3} = \frac{[CyS(=O)SCy^{-}][H^{+}]}{[CyS(=O)SCy^{0}]}$ $CyS(=O)SCy^0 \rightleftharpoons CyS(=O)SCy^- + H^+$ $K_{a4} = \frac{[CyS(=O)SCy^{2-}][H^+]}{[CyS(=O)SCy^{-1}]}$ $CyS(=O)SCy^- \rightleftharpoons CyS(=O)SCy^{2-} + H^+$ $k_0 = (5.0 \pm 0.01) \times 10^3 \mathrm{M}^{-1} \mathrm{s}^{-1} / \mathrm{P}_0$ $CyS(=O)SCy^0 + OH^- \rightarrow termékek$ $k_1 = 60 \pm 18 \mathrm{M}^{-1} \mathrm{s}^{-1} / \mathrm{P}_1$ $CyS(=O)SCy^- + OH^- \rightarrow termékek$ $CyS(=O)SCy^{2-} + OH^{-} \rightarrow termékek$ $k_2 = 0.36 \pm 0.01 \mathrm{M}^{-1} \mathrm{s}^{-1} / \mathrm{P}_2$ Reakciósebesség = $\frac{-d[CyS(=O)SCy]_{tot}}{dt}$ $= \left(P_0 \cdot k_0 [H^+]^2 + P_1 \cdot k_1 K_{a3} [H^+] + P_2 \cdot k_2 K_{a3} K_{a4} \right) \frac{[OH^-]}{[H^+]^2 + K_{a3} [H^+] + K_{a3} K_{a4}}$

9. séma CyS(=O)SCy hidrolízisére levezetett sebességi egyenletek a CyS(=O)SCy 1 illetve 2 protonálódási folyamatát figyelembe véve.

Érdekességképp említeném meg, hogy egy olyan egyszerűnek látszó kinetikai probléma, mint a CyS(=O)SCy hidrolízise, mélyebb analízisét követően (a reakciósebesség koncentráció- és pH-függése, egy köztitermék (a tioszulfonát-észter) és a végtermékek detektálása és szerkezetének meghatározása NMR módszerrel) 16 potenciális kinetikai modellt kellett javasolnunk, amelyek kísérletesen nem voltak elkülöníthetőek (illetve valószínűleg a pH függvényében különböző körülmények között aktiválódhatnak vagy deaktiválódhatnak):

1	2 {RS(=O)SR \rightarrow 2 RSOH} 2 {RSOH + RS(=O)SR \rightarrow RSSR + RSO ₂ H}	9	$RS(=O)SR \rightarrow RSH + RSO_{2}H$ 2 RSOH \rightarrow RSH + RSO ₂ H} 2 {RSH + RS(=O)SR \rightarrow RSOH + RSSR}
2	$RS(=O)SR \rightarrow 2 RSOH$ $2 {RSH + RSOH \rightarrow RSSR}$ $2 {RS(=O)SR \rightarrow RSH + RSO_2H}$	10	$RS(=O)SR \rightarrow RSH + RSO_{2}H$ $RSH + RSO_{2}H \rightarrow 2 RSOH$ $2 \{RSOH + RS(=O)SR \rightarrow RSO_{2}H + RSSR \}$
3	$RS(=O)SR \rightarrow 2 RSOH$ $2 \{2 RSOH \rightarrow RSH + RSO_{2}H\}$ $2 \{RSH + RS(=O)SR \rightarrow RSOH + RSSR\}$	11	$RS(=O)SR \rightarrow RSH + RSO_{2}H$ $RSH + RS(=O)SR \rightarrow RSOH + RSSR$ $RSOH + RS(=O)SR \rightarrow RSO_{2}H + RSSR$
4	$RS(=O)SR \rightarrow 2 RSOH$ $2 \{RSO_{3}H + RSOH \rightarrow 2 RSO_{2}H\}$ $2 \{RSO_{2}H + RS(=O)SR \rightarrow RSSR + RSO_{3}H\}$	12	$RS(=O)SR \rightarrow RSH + RSO_{2}H$ $RSH + RS(=O)_{2}SR \rightarrow RSO_{2}H + RSSR$ $2 RS(=O)SR \rightarrow RS(=O)_{2}SR + RSSR \}$
5	$RS(=O)SR \rightarrow 2 RSOH$ $2 \{RSOH + RS(=O)SR \rightarrow RSH + RS(=O)_2SR \}$ $2 \{RSH + RS(=O)_2SR \rightarrow RSO_2H + RSSR \}$	13	2 {RS(=O)SR -> RSH + RSO ₂ H} 2 {RSH + RSOH \rightarrow RSSR} RS(=O)SR \rightarrow 2 RSOH
6	$RS(=O)SR \rightarrow 2 RSOH$ $2\{RS(=O)_2SR+RSOH\rightarrow RSO_2H+RS(=O)SR\}$ $2\{2 RS(=O)SR \rightarrow RSSR + RS(=O)_2SR\}$	14	2 {RS(=O)SR \rightarrow RSH + RSO ₂ H} RSH + RSOH \rightarrow RSSR RSH + RS(=O)SR \rightarrow RSOH + RSSR
7	$RS(=O)SR \rightarrow 2 RSOH$ $2 \{RS(=O)_2SR + RSOH \rightarrow RSO_3H + RSSR\}$ $2 \{RSO_3H + RS(=O)SR \rightarrow RSO_2H + RS(=O)_2S\}$	15	2 {RS(=O)SR \rightarrow RSH + RSO ₂ H} 2 {RSOH \rightarrow RS(=O)SR} 2 {RSH + RS(=O)SR \rightarrow RSOH + RSSR}
8	$3 \{RS(=O)SR \rightarrow 2 RSOH\}$ $2 \{RSH + RSOH \rightarrow RSSR\}$ $2 \{2 RSOH \rightarrow RSH + RSO_2H\}$	16	3 {RS(=O)SR \rightarrow RSH + RSO ₂ H} 2 {RSH + RSOH \rightarrow RSSR} RSH + RSO ₂ H \rightarrow 2 RSOH

10. séma A CyS(=O)SCy hidrolízisére javasolt lehetséges reakcióutak.

Mindezen eredményeket figyelembe véve és a Cys mikroszkópikus savi disszociációs állandóit használva, a HOX Cys-nel való reakcióinak összetett kinetikai vizsgálatának eredményeit a következő kinetikai modellel tudtuk magyarázni:

$$\begin{aligned} \text{HOCl} \rightleftharpoons \text{H}^{+} + \text{OCl}^{-} & pK_{a}^{\text{HOCl}} = 7,5 \\ \text{CySH}^{0} \rightleftharpoons \text{CyS}^{-} + \text{H}^{+} & pK_{a2s}^{\text{CySH}} = 8,5 \\ \text{CySH}^{-} \rightleftharpoons \text{CyS}^{2^{-}} + \text{H}^{+} & pK_{a3s}^{\text{CySH}} = 10,0 \\ \text{CySOH}^{-} \rightleftharpoons \text{CySO}^{2^{-}} + \text{H}^{+} & pK_{a3s}^{\text{CySH}} = 10,0 \\ \text{CySOH}^{-} \rightleftharpoons \text{CySO}^{2^{-}} + \text{H}^{+} & pK_{a3s}^{\text{CySH}} = 10,0 \\ \text{CySOH}^{-} \rightleftharpoons \text{CySO}^{2^{-}} + \text{H}^{+} & pK_{a3s}^{\text{CySH}} = 10,0 \\ \text{CyS}^{2^{-}} + \text{HOCl} \rightarrow \text{CySCl}^{-} + \text{OH}^{-} & k_{1} = 1,2 \times 10^{9} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \\ \text{CyS}^{2^{-}} + \text{OCl}^{-} + \text{H}_{2}\text{O} \rightarrow \text{CySCl}^{-} + 2 \text{OH}^{-} & k_{1} = 1,2 \times 10^{9} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \\ \text{CySCl}^{-} + \text{OH}^{-} \rightarrow \text{CySO}^{2^{-}} + \text{H}^{+} + \text{Cl}^{-} & k_{2} = 1,9 \times 10^{5} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \\ \text{CySCl}^{-} + \text{OH}^{-} \rightarrow \text{CySO}^{2^{-}} + \text{H}^{+} + \text{Cl}^{-} & k_{23} = 10^{5} - 10^{8} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \\ 2 \rightarrow 3 \text{ CySOH}^{-} + \text{CyS}^{-} \rightarrow \text{CySSCy}^{2^{-}} + \text{H}_{2}\text{O} & k_{23} = 10^{5} - 10^{8} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \\ 2 \rightarrow 3 \text{ CySOH}^{-} + \text{CyS}^{2^{-}} \rightarrow \text{CySSCy}^{2^{-}} + \text{H}_{2}\text{O} & k_{23} = 10^{5} - 10^{8} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \\ 4 \rightarrow 5 \text{ CySOH}^{-} + \text{CyS}^{2^{-}} \rightarrow \text{CySSCy}^{2^{-}} + \text{OH}^{-} & k_{23}^{-} = 1,840(3) \times 10^{15} \text{M}^{-2} \text{s}^{-1} \times \text{K}_{a}^{\text{CySOH}}\text{M} \\ 4 \rightarrow 5 \text{ CySOH}^{-} + \text{CySO}^{2^{-}} \rightarrow \text{CySSCy}^{2^{-}} + \text{OH}^{-} & k_{45} = \text{összemérhető a } k_{23} \text{-al } \text{pH} < 12 \text{-nell} \\ 8 \rightarrow 9^{\circ} \text{CyS}(=0) \text{SCy}^{2^{-}} + \text{CyS}^{-} \rightarrow \text{CySSCy}^{2^{-}} + \text{CySO}^{2^{-}} + \text{H}^{+} & k_{89^{\circ}} = 3,6(7) \times 10^{3} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \\ 8 \rightarrow 9^{\circ} \text{CyS}(=0) \text{SCy}^{2^{-}} + \text{CyS}^{2^{-}} \rightarrow \text{CySSCy}^{2^{-}} + \text{CySO}^{2^{-}} & k_{89^{\circ}} = 4,6(3) \times 10^{3} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \end{aligned}$$

11. séma A Cys + HOCl rendszerben detektált reakciókra javasolt kinetikai modell.

A kinetikai mérések adatpontjait a fenti mechanizmus alapján levezetett sebességi egyenlettel illesztve két biológiai szempontból nagyon fontos határértéket tudtunk megállapítani (47. ábra):

1) A CySOH savi disszociációs állandója 6 és 10 közötti érték.

2) A CySOH CyS-el való reakciójának másodrendű sebességi állandója, sztérikus gátlás hiányában, pH = 7-nél a $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ értéknél nagyobb.



47. ábra A CySOH savi disszociációs állandójának és a CySOH-CyS reakció látszólagos másodrendű sebességi állandójának határértékei (pH = 7-en). (A) A hidrogénionkoncentráció és a k_{eff} viszonya a CySOH és CySH közötti reakcióban, pH<12 esetén. A CySOH-t *in situ* generáltuk CySH és HOX reakciójával, ahol X=Cl (\circ) vagy Br (\Box). A folytonos vonal az adatoknak a 11. sémában bemutatott modell alapján levezetett egyenlettel való legkisebb négyzetes illesztését mutatja.^{*C8*} (B) A CySOH és CySH közötti reakció 11. sémában látható modell alapján levezetett egyenlettel való legkisebb négyzetes illesztését mutatja.^{*C8*} (B) A CySOH és CySH közötti reakció 11. sémában látható modell alapján levezetett egyenlettel való legkisebb négyzetes illesztését (folytonos vonal) szerepelnek. Szintén láthatók a k_{23} illesztett értékei (rövid szaggatott vonal), amelyeket $k_{23'}/K_a^{CySOH}$ nagy pH-n meghatározott rögzített értéke (1,840(3) × 10¹⁵ M⁻²s⁻¹) mellett kaptunk. A $k_{23'}$ becsült hibája $K_a^{CySOH} > 12$ esetén meghaladja a szórás értékét (megj. az adatok illesztéséhez csak egy sebességi állandóra volt szükség).^{*C8*}.

Ha a Cys—HOCl rendszerben a HOCl-at alkalmaztuk feleslegben a Cys-hez képest vagy nem turbulens keverést alkalmaztunk, akkor a reakció relatíve stabilis átmeneti termékeként képződött a cisztin N,N'-diklóramin származéka (NDC; 48. ábra).^{C17}



48. ábra Cisztin-N,N'-diklóramin szerkezeti képlete.

A molekula szerkezetét és kémiai tulajdonságait ¹H-NMR és UV-látható spektroszkópiai módszerekkel vizsgáltuk. Igazoltuk, hogy a monoklóraminhoz képest a diklóramin származék képződése kedvezményezett, de a diklóramin bomlása során a monoklóramin származék köztitermékként detektálható volt. Szisztematikus stopped-flow kinetikai méréssorozat eredményeképp a 12. sémán látható modellt javasoltuk az NDC képződésére. A modell alapján levezetett sebességi egyenlettel az összes adatpont jól

illeszthető volt (pH-függés illesztését a 49. ábra mutatja). A különböző reakció utak relatív hozzájárulásait numerikus módszerrel számoltuk (49. ábra szaggatott vonalak).

 $H^{+} + OCI^{-} \rightleftharpoons HOCI \qquad K_{1} = 1 / K_{a}^{HOCI} = 10^{7,47} M^{-1}$ cisztin⁰ $\rightleftharpoons H^{+} + cisztin^{-} \qquad K_{2} = 10^{-8,15} M$ cisztin⁻ $\rightleftharpoons H^{+} + cisztin^{2-} \qquad K_{3} = 10^{-9,00} M$ cisztin⁻ $+ HOCI \rightleftharpoons NCC + H_{2}O \qquad k_{4} = 4,3 \times 10^{6} M^{-1} s^{-1}$ cisztin² $+ HOCI \rightleftharpoons NCC + H_{2}O \qquad k_{5} = 1,6 \times 10^{7} M^{-1} s^{-1}$ NCC $+ HOCI \rightleftharpoons NDC + H_{2}O \qquad k_{6} = gyors$ [HOCI]₀^T = [HOCI] $+ [OCI^{-}]$ [cisztin]₀^T = [cisztin⁰] $+ [cisztin^{-}] + [cisztin^{2-}]$

$$\frac{d[NCC]}{dt} = \frac{(K_2 k_4 [H^+] + K_2 K_3 k_5 [cisztin]_0^1}{(1 + K_1 [H^+])([H^+]^2 + K_2 [H^+] + K_2 K_3)} [HOC1]^T$$

12. séma Cisztin és HOCl reakciójának javasolt mechanizmusa, egyensúlyi és sebességi állandói (5 °C-on) és sebességi egyenlete pszeudo-elsőrendű körülmények között (cisztin felesleg mellett). Az NCC a 48. ábrán látható diklóraminnak megfelelő monoklóramin származék.



49. ábra *Felső panel*: Számított k_{eff} értékek a k_4 (pontozott-szaggatott), k_5 (szaggatott) és a kombinált k_4 - k_5 (folytonos) reakcióutak esetén, 5 °C-on (lásd 12. séma). A mért k_{eff} értékek

($^{\circ}$) a hibasávként jelölt szórásokkal együtt szintén láthatók. *Alsó panel*: HOCl (folytonos), OCl⁻ (pontozott-szaggatott), cisztin⁰ (rövid szaggatott), cisztin⁻ (pontozott) és cisztin²⁻ (hosszú szaggatott) részecskék számított eloszlása 5 °C-on. Az ábrán szereplő görbék kiszámításához használt paraméterek: $K_1 = 3,39 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$, $K_2 = 7,08 \times 10^{-9} \text{ M}$, $K_3 = 1,00 \times 10^{-9} \text{ M}$, $k_4 = 4,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $k_5 = 1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. A HOCl, cisztin⁰ és cisztin⁻ részecskék p K_a értékeit nyilakkal jeleztük.^{C17}

Hasonló kísérletsorozatot végeztünk a GSSG HOCl-val való oxidációjának vizsgálatára^{C18}. Megállapítottuk, hogy ebben az esetben is kedvezményezett a diklóramin származék képződése és pH = 7-en a domináns reakcióút az egyik amincsoportján deprotonált cisztin formán és a HOCl bimolekuláris reakcióin keresztül zajlik (A 13. sémán látható k_4 reakcióút; lásd 50. ábra).

 $\mathrm{H}^{+} + \mathrm{OCl}^{-} \rightleftharpoons \mathrm{HOCl} \qquad \qquad K_{1} = 1 / \mathrm{K}_{\mathrm{a}}^{\mathrm{HOCl}} = 10^{7,47} \mathrm{M}^{-1}$

 $GSSG^{2-} \rightleftharpoons H^+ + GSSG^{3-} \qquad K_2 = 10^{-8.5}M$

 $GSSG^{3-} \rightleftharpoons H^+ + GSSG^{4-} \qquad K_3 = 10^{-9.5}M$

 $GSSG^{3-} + HOCI \rightleftharpoons NCG + H_2O k_4 = 2.7 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$

$$GSSG^{4-} + HOCI \rightleftharpoons NCG + H_2O k_5 = 3.5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$$

NCG + HOCl $\rightleftharpoons^{\text{H}^+}$ NDG + H₂O $k_6 = \text{gyors}$ [HOCl]_0^T = [HOCl] + [OCl^-]

 $[\text{GSSG}]_0^{\text{T}} = [\text{GSSG}^{2-}] + [\text{GSSG}^{3-}] + [\text{GSSG}^{4-}]$

$$\frac{d[NDG]}{dt} = \frac{(K_2k_4[H^+] + K_2K_3k_5[GSSG]_0^T)}{(1 + K_1[H^+])([H^+]^2 + K_2[H^+] + K_2K_3)}[HOC1]^T$$

7.4-es pH-n a k4 reakcióút dominál.

13. séma GSSG és HOCl reakciójának javasolt mechanizmusa, egyensúlyi és sebességi állandói (5 °C-on) és sebességi egyenlete pszeudo-elsőrendű körülmények között (GSSG felesleg mellett). Az NDC és NDG a 48. ábrán látható Cys-diklóraminnak megfelelő GSSG mono- vagy bisz-N-kloro-g-L-glutamil származékai.



50. ábra *Felső panel*: Számított k_{eff} értékek a k_4 (pontozott-szaggatott), k_5 (szaggatott) és a kombinált k_4 - k_5 (folytonos) reakcióutak esetén, 5 °C-on. A mért k_{eff} értékek (\circ) a hibasávként jelölt szórásokkal együtt szintén láthatók. *Alsó panel*: HOCl (folytonos), OCl⁻ (pontozott-szaggatott), GSSG²⁻ (hosszú szaggatott), GSSG³⁻ (pontozott) és GSSG⁴⁻ (rövid szaggatott) részecskék számított eloszlása 5 °C-on. ^{C18}

A reakciók sebessége alapján egy E. coli baktérium citoplazmájának megfelelő koncentrációviszonyok között végzett kinetikai modellezésünk arra utal, hogy a reakció védelmet nyújthat a hisztidin aminosavak illetve a fehérjékben, peptidekben található diszulfid hidak HOCl-val való oxidációjával szemben. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy az aminokkal való reakciókban a HOCl-nál specifikusabb másodlagos oxidálószerekként számon tartott klóraminok képződnek, amik továbbra is oxidatív stresszt generálhatnak (51. ábra).



51. ábra E. coli citoplazmájában található HOCl in vivo reakcióinak szimulációja a GSH mennyiségének függvényében (ld. szöveg). A nyíl a vad típusú E. coli-ban található várható GSH koncentrációt jelzi. A szimulációban használt HOCl-koncentráció ennek

négyszerese volt. A jelölt pont után az összes GSH oxidált formában van, innen számíthatunk a GSSG oxidációjára NDG-vé. A modellnek ezen a pontján valamennyi oxidálószerek által hozzáférhető fehérje-tiol- és tioétercsoport oxidálódott. A maradék diszulfidok %-os arányát ábrázoltuk olyan modellből, amely figyelembe veszi (folytonos vonal) illetve nem veszi figyelembe (szaggatott vonal) a GSSG oxidációját. Hasonlóan, a maradék His és terminális amincsoportok százalékos arányát is ábrázoltuk a GSSG oxidációjának figyelembe vétele (pontozott-szaggatott vonal) és elhanyagolása (pontozott vonal) mellett.^{C18}

Nukleofil ágensek távollétében a diklóramin származékok bomlásának felezési ideje pH = 7-nél \sim 30 perc, ami biológiai időskálán viszonylag hosszúnak számít. Kísérletesen igazoltuk azonban, hogy az NDG-t a glutation-reduktáz enzim GSSG-hez fogható szubsztrátként használja és NADH jelenlétében katalitikusan GSH-ná redukálja (52. ábra).

Azon észleléseink és irodalmi adatok alapján, hogy:

- a GSH-hiányos *E. coli* mutáns (JTG10) törzs kétszer olyan érzékeny a hipoklórossavra, mint a természetben előforduló⁷⁹,
- extracelluláris GSH vagy GSSG hozzáadása a JTG10-es mutáns törzshöz visszaállítja a rezisztenciát az eredeti értékre,
- a sejtek 50%-a életben maradt, amikor a citoplazma GSH tartalmának 150%-a oxidálódott HOCl hozzáadására, ami felveti az NDG *in vivo* keletkezésének a lehetőségét,
- az NDG felezési ideje 7-es pH-n > 30 min és ez a diklóramin származék még extrém, millimólos koncentrációban sem toxikus az *E. coli* baktériumra nézve,

arra következtethetünk, hogy a sejtek citoszoljában található GSH antioxidáns kapacitása az eddig véltnél 3-szor nagyobb lehet a HOCl-val szemben.



52. ábra NDG NADPH általi redukciójának 340 nm-en mért kinetikai görbéi, glutation-reduktáz jelenlétében és távollétében (GOR és GOR nélkül, rendre). Az enzimkatalizált reakció pszeudo-elsőrendű szakaszának lineáris illesztését a szaggatott vonal jelzi. ^{C18}

Szisztematikus enzimkinetikai vizsgálatokat végeztünk a glutation-reduktáz által katalizált NDG redukciójával kapcsolatban (nem publikált adatok).

Az alábbi lehetséges reakcióutakat alapul véve terveztük az enzimkinetikai méréssorozatot:

1) GSSG autokatalízis:

 \sim SS \sim NCl + NADPH → GSSG + Cl⁻ + H⁺ + NADP GSSG + GOR^{red} → 2 GSH + GOR^{ox} 2GSH + \sim SS \sim NCl → GSSG + \sim SS \sim NH + Cl⁻ + H⁺

2) Az NDG N–Cl kötésének enzimatikus redukciója: \sim SS \sim NCl + GOR^{red} $\rightarrow \sim$ SS \sim NH + GOR^{Cl} GOR^{Cl} \rightarrow GOR^{ox} + Cl⁻ + H⁺

3) Az NDG S−S kötésének enzimatikus hasítása, amit intermolekuláris klóramin + ~SH reakció követ: CIN~SS~NCl + GOR^{red} → 2ClN~SH + GOR^{ox}

 $CIN \sim SH + \sim SH \rightarrow HN \sim SH + \sim SCI$ $\sim SCI + \sim SH \rightarrow \sim SS \sim + CI^{-} + H^{+}$

4) Az NDG S–S kötésének hasítása és intermolekuláris Cl⁺transzfer: $CIN\sim SS\sim NCl + GOR^{red} \rightarrow 2CIN\sim SH + GOR^{ox}$ $CIN\sim SH \rightarrow HN\sim SCl$ $HN\sim SCl + \sim SH \rightarrow HN\sim SS\sim + Cl^{-} + H^{+}$

14. séma Az NDG GOR enzim által katalizált redukciójára felállított 4 potenciális mechanizmus.

Méréseink rávilágítottak a következőkre:

- Az enzim (GOR) távollétében az NDG reagál ugyan NADPH-val, de csak lassan, és a reakció végterméke a diszulfid (GSSG).
- GOR jelenlétében a NDG gyors pszeudo-nulladrendű reakcióban redukálódik.
- A redukció végterméke a redukált glutation (GSH) (¹H NMR mérések alapján).

NDG + 3NADPH $\xrightarrow{\text{GOR}} 2$ GSH

- A GOR^{red} + NDG reakció sztöchiometriája 1:3. Az adott körülmények között az egyes reakciólépések lényegesen gyorsabbak, mint a GSH + NDG reakció (függetlenül mérve).
- A GOR enzim specifikus aktivitása hasonló GSSG-re (234 mmol •min⁻¹ •mg⁻¹) és NDG-re (69 mmol •min⁻¹ •mg⁻¹) nézve.
- A GOR kötőzsebében a GSSG amin csoportjai kifelé (az oldószer felé) néznek ami arra utal, hogy kötött NDG esetén a klóramin funkciós csoportoknak nem valószínű, hogy van hozzáfáráse az enzim aktív centrumában lévő katalitikus ciszteinekhez.

Mindezek alapján a 4 lehetséges modell közül (14. séma) az első 3 kizárása után a 4.-et javasoljuk, amely szerint a reakció az –S–S– hidak redukcióját követően a 53. ábrán látható javasolt köztiterméken keresztüli intramolekuláris Cl⁺ transzfer útján újra diszulfid híd képződéséhez vezet, amit az enzim a szokásos módon redukál (nem közölt eredmények).



53. ábra Az NDG enzim katalizált redukciója közben képződő köztitermék javasolt szerkezeti képlete. (lásd 14. séma 4. modell)

4.2.5 Cisztein reakciói peroxiddal

UV-látható spektroszkópiával végzett kinetikai vizsgálatainkból a H₂O₂-nak a Cys tiolát formájával való reakciójára kapott másodrendő sebességi állandó ($k = 14,62 \pm 0,08$

 $M^{-1}s^{-1}$)^{C20} jól egyezik a HPLC-vel korábban mért irodalmi értékkel⁸⁰. ¹H-NMR-rel végzett köztitermék analízis, numerikus módszerrel végzett kinetikai szimuláció és *stopped-flow* módszerrel mért kezdeti sebességek alapján azonban a Luo és társszerzői 2005-ös cikkben⁸⁰ javasolt mechanizmus sebesség-meghatározó reakcióját követő lépésekkel nem értünk egyet. A CySOH és Cys reakcióra pH = 7,4-en javasolt $k = 720 \pm 70 M^{-1}s^{-1}$ másodrendű sebességi állandó az 54- 55. ábrán látható mérések alapján alábecsült érték és inkább a 4.2.4 fejezetben javasolt $k > 10^5 M^{-1}s^{-1}$ -es értékkel van összhangban.



54. ábra Cisztin (CySSCy) képződése ciszteinből (CyS) H₂O₂-dal való oxidáció során. A reakció időfüggését ¹H-NMR módszerrel követtük, az ábrán a H_{α} régió látható 5 perccel a reakció indítása után. CyS (levágott csúcsok) és CySSCy keverékét detektáltuk. A vízszintes vonal 4% CySOH becsült csúcsmagasságát mutatja (feltéve, hogy a CySOH csatolási mintázata és vonalszélessége a CyS-éhoz hasonló). Az adott időpillanatban a Luo és társszerzői 2005-ben megjelent cikkben⁸⁰ javasolt sebességi állandók mellett ennyi CySOH kellene jelen legyen. Ezt azonban nem sikerült detektálni.^{C19}



55. ábra CySSCy képződési sebessége a CyS, H₂O₂-dal való reakciójában. (A) Az első 5% CySSCy képződésének szimulált kinetikai görbéi a CySOH - CySH reakció látszólagos másodrendő sebességi állandóját a Luo és Smith⁸⁰ által javasolt $k = 720 \pm 70 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (I modell, folytonos vonalak) és az általunk mért $k > 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (II model, szaggatott vonalak) értékeket használva, $[\text{CyS}]_0^{\text{T}} = 5 \text{ mM}$ és $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 10-50 \text{ mM}$, pH = 7,4 feltételek mellett. A görbék illusztrálják az I modellből következő S-alakú indukciós periódust és a II modellből származó lineáris viselkedést egyaránt (kezdeti sebesség feltételeket alkalmazva). (B) 270
nm-en mért abszorbancia-növekedés a $[CSH]_0^T = 5 \text{ mM}$ és $[H_2O_2]_0 = 10-50 \text{ mM}$ reakcióban, pH = 7,4 esetén. Az A és B paneleken a skálák egymásnak megfelelők. A mért görbék az (A) ábrán látható II modell alapján szimulált egyenesekkel korrelálnak.^{C19}

4.2.6 Tiol fehérjék reakciói peroxiddal

Néhány fehérje aktív centrumában lévő cisztein aminosav reaktivitása peroxiddal a szabad aminosavval mért érték sokszorosa is lehet. A legextrémebb példa a peroxiredoxin fehérje család, melyek peroxidatív ciszteinjei (CyS_p) 7 nagyságrenddel nagyobb másodrendű sebességi állandóval reagálnak H₂O₂-dal mint a szabad Cys aminosav⁸¹. A peroxiredoxinok olyan tiol peroxidáz enzimek, amelyek megfelelő származékai az evolúció során gyakorlatilag minden organizmusban megtalálhatók. A humán Prx család 6 különböző izoformája ismert⁸². Jelenlegi tudásunk szerint a Prx1 és 2 a sejtek citoszoljában, a Prx3 és 5 a mitokondriumban, a Prx4 pedig az ER-ben található. Redoxiaktivitásukban jellemzően 2 Cys aminosav játszik főszerepet (kivéve a Prx5, amelyből a redukáló Cys hiányzik). A peroxidatív Cys reagál a peroxiddal és a képződő CyS_p-SOH egy másik Prx redukáló Cys komponensével (CyS_r) reagálva dimerizálódik (56. ábra). A dimer visszaredukálását aktív monomerré leginkább a Trx rendszer végzi TrxR és NADPH segítségével (lásd később)^{C10}.



56. ábra Prx fehérjék peroxidáz funkciójának általános mechanizmusa. A peroxidatív cisztein tiol (S_p) a peroxiddal reagálva CyS_pOH köztiterméket képez. A Prx-CyS_pOH forma egy másik Prx redukáló ciszteinjének redukáló tioljával (S_r) reagál és diszulfid képződik. Egy alternatív reakcióúton a CyS_pOH képes tovább oxidálódni a megfelelő CyS_pO₂H formává egy második ekvivalens peroxid hatására. A diszulfidok redukcióját a tioredoxin/tioredoxin reduktáz rendszer (Trx/TrxR) végzi (NAPDH felhasználásával), míg a CyS_pO₂H formából a szulfiredoxinok termelik újra a redukált fehérjét ATP segítségével. *C10*

Első megközelítésben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy mi a Prx család peroxidokkal való nagy reaktivitásának és specificitásának a molekuláris magyarázata^{C21}.

Baktériumban való expresszálás és tisztítás segítségével készítettünk vad típusú rekombináns humán Prx2 és 3 fehérjéket. Katalázzal való kompetíciós kinetikai kísérleteink arra utaltak, hogy a rekombináns Prx-ek a humán sejtekből izolált formákhoz hasonlóan kimagasló reaktivitást mutatnak H₂O₂-dal (57. ábra).



57. ábra Rekombináns Prx2 és Prx3 kinetikai vizsgálata. Prx2 (A) és Prx3 (B) kompetíciója H₂O₂-ért szarvasmarha katalázzal. Az *első* és *második* sáv a redukált és oxidált Prx-ek arányát mutatja a 0 időpillanatban és 15 s kezelés után. A többi sávban ugyanez az arány látható megadott mennyiségű kataláz jelenlétében. A Prx oxidáció elleni védelem jól követhető, mivel a Prx monomer aránya a kataláz mennyiségének növelésével párhuzamosan nő. A gélek 3 független kísérlet reprezentációi. Prx2 (C) vagy Prx3 (D) és H₂O₂ közötti másodrendű sebességi állandó meghatározása HRP-vel való kompetíciós kísérletben. A másodrendű sebességi állandókat (lásd 4. táblázat) az egyenesek meredekségeiből becsültük meg; *F*: inhibíciós hányad.⁸³ A hibasávok három párhuzamos kísérlet szórásait mutatják. A kísérletet különböző napokon ismételtük meg, hasonló eredményekkel.^{C21}

A másodrendű sebességi állandókat az irodalomban jól ismert HRP kompetíciós spektrofotometriás módszer segítségével becsültük⁸³. A módszer lényege, hogy a peroxid HRP-vel reagálva a relatíve stabilis compound I komplexet képzi (3. séma), melynek kvantitatív detektálása a HRP hem csoportjának elnyeléséhez tartozó Szoret-sávján jól megvalósítható. Prx jelenlétében a HRP-vel való kompetíció alapján az ismert HRP-peroxid

sebességi állandó és az alkalmazott koncentrációk segítségével a Prx peroxiddal való reakciójának sebességi állandója becsülhető volt (57.C.D. ábra). A mért sebességi állandók $(1,6 \pm 0,1) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $(1,9 \pm 0,1) \times 10^7 \text{ jól egyeznek az izolált Prx2 és Prx3-ra mért értékekkel^{81, 84}}$.

A Prx-tiol és peroxid közötti reakció is egy nukleofil-elektrofil redoxireakció (15. séma), ezért a reakció sebesség növelésének (azaz az aktiválási energia csökkentésének) kézenfekvő módjai 1) a kéncentrum nukleofilicitásának növelése, 2) a reagáló peroxidoxigén elektrofilicitásának növelése vagy 3) a távozó (-OH) csoporttal való ionpár képzés vagy annak részleges protonálása.



15. séma A Prx-H2O2 reakcióra javasolt SN2 modell.

A Prx fehérjék publikált kristályszerkezeteit tanulmányozva szembetűnt két, az összes Prxben azonos pozíciót elfoglaló és gyakorlatilag az összes organizmus Prx származékainak minden izoformájában konzerváltan előforduló Arg aminosav komponens (58. ábra).



58. **ábra A Prx3 aktív centruma.** A Prx3 aktív centrumában két konzervált arginin egység található, amelyek a peroxidáz aktivitásban kiemelt szerepet töltenek be. (A) Szarvasmarha

Prx3 peroxidatív ciszteinjét (Cys-47) körülvevő aktív centrumának szerkezete (PDB 1ZYE). (B) ArgI (Arg-123) és ArgII (Arg-146) nitrogénjeinek távolsága a Cys47 (C_p) kénatomtól a szarvasmarha Prx3 kristályszerkezetében (PDB 1ZYE).^{C21}

A két Arg nitrogénjeinek peroxidatív Cys tioljától való távolságai (58.B. ábra) arra utalnak, hogy guanidium funkciós csoportjaik részt vehetnek a H₂O₂ aktív centrumban való kötődésében. Ha a H₂O₂-ot az általunk javasolt orientációval berajzoljuk az aktív centrumba, akkor jól látható, hogy a két Arg pozíciója ideális, ahhoz hogy H-híd kötések mentén segítse annak kötődését (59. ábra). Az így kialakuló H-híd kötések elősegíthetik a Cys tiolon való elektrofil támadást, a peroxid O-O kötés szakadásának aktiválását és a távozó OH⁻ parciális protonálódását.



59. ábra A H₂O₂ kötődésének javasolt orientációja és a katalízist segítő H-hidak szemléltetése a Prx-ok H₂O₂-dal való reakciójának javasolt átmeneti komplexének szerkezetén. Az ábrán a szarvasmarha Prx3 peroxidatív ciszteinjét (Cys-47) körülvevő aktív centrumának szerkezete (PDB 1ZYE) látható. ^{C10}

Katalitikus szerepeik kísérletes vizsgálata céljából olyan pontmutánsokat készítettünk, melyekben az egyik vagy mindkét Arg-t egy másik aminosavra cseréltünk. A Cys-hez közelebbi ArgI (ami Arg127-nek felel meg Prx2 és Arg123-nak Prx3 esetén) pontmutációja esetén azt tapasztaltuk, hogy a H₂O₂-dal való reakció sebessége drasztikusan lecsökkent. A vad típushoz képest ezen mutánsok reakcióinak sebessége annyira lelassult, hogy azokat egyszerű kézi keverés mellett, katalázzal (a reakciópartner H₂O₂ elroncsolása révén) megállítva, WB analízissel tudtuk követni (60. ábra).



60. ábra Prx pontmutánsok (ArgI, ArgII és ArgI/ArgII) és H₂O₂ közötti oxidációs reakciók időbeli lefolyása. A Prx3 (A-C) és Prx2 (D-F) argininjeit glicinre (Prx3) vagy lizinre (Prx2) cseréltük. Az adatpontok a redukált Prx fogyásának százalékos arányát mutatják a Prx összmennyiségéhez képest (dimer+monomer, ld. a feltüntetett géleken). A másodrendű sebességi állandókat exponenciális görbe illesztéséből kaptuk (lásd. 4. táblázat). A reakciókat katalázzal (A) vagy N-etilmaleimiddel (NEM) (C-F) állítottuk le.^{C21}

A WB-okon látható a redukált (monomer) és oxidált (dimer) formák arányainak kvantitálása alapján felvett kinetikai görbék analíziséből kiderült, hogy az ArgI pontmutáció mindkét izoform esetén, a beillesztett új aminosavtól függetlenül, 5 nagyságrendnyi reaktivitás csökkenéshez vezetett. Meglepő módon a CyS_p-től távolabb eső ArgII (a Prx3-ban Arg146, a Prx2-ben Arg150) mutációja szintén 5 nagyságrendnyi aktivitáscsökkenést okozott. Mindkét Arg szimultán mutációja pedig a Prx-ek reaktivitását a Cys aminosav

Prx3	$k_{\rm eff} ({ m M}^{-1}{ m s}^{-1})$
WT	$(1,9\pm 0,1) \times 10^{7}$
R146A	$(2 \pm 0,5) \times 10^2$
R146H	$(3\pm1) imes10^2$
R146K	$(4\pm2) imes10^2$
R146G	$(2 \pm 0,9) \times 10^2$
R123G	$(7\pm2) imes10^2$
R123G/R146G	$2 \pm 0,5$
Prx2	$k_{\rm eff} ({ m M}^{-1}{ m s}^{-1})$
WT	$(1,6\pm 0,1) \times 10^{7}$
R150K	$(6 \pm 3) \times 10^2$
R127K	$(3\pm2)\times10^2$
P127K/P150K	2 + 1

reaktivitásának megfelelő értékre (a vad típuséhoz képest az adott pH-n 7 nagyságrenddel) csökkentette (lásd a 4. táblázat adatait).

4. táblázat A rekombináns vad típusú és pontmutációkat tartalmazó Prx-ek H₂O₂-dal való reakcióinak mért látszólagos másodrendű sebességi állandói pH = 7,4-en ($M^{-1}s^{-1}$ -ben).

A mérések tehát az 59. ábrán javasolt köztitermék potenciális képződése mellett szólnak, ahol a CyS_p -hez közeli Arg H-híd kötések révén odahorgonyozza a kénatomhoz a peroxid reagáló oxigénjét, illetve növeli annak elektrofilicitását az elektronsűrűség csökkentésén keresztül. A CyS_p -től távolabbi Arg, javaslatunk szerint a távozó OH⁻-csoport protonálódásán keresztül csökkentheti a reakció aktiválási energiáját.

Leo Radom kutatócsoportjával együttműködve az Arg aminosavak reaktivitásnövelő szerepét elméleti számolásokkal is alátámasztottuk. A számolások nemcsak azt mutatták meg, hogy a javasolt H-híd kötések valóban katalitikus hatásúak (61. ábra), hanem az alkalmazott G4 módszer, az aktiválási entalpia tagok számolásán keresztül, lehetővé tette a katalitikus hatás nagyságrendi becsléseit is, amelyek kiválóan egyeztek a mért adatokkal (61. ábra).



61. ábra *Ab initio* számítások guanidium, HF és H₂O részecskék H-kötés képzésének katalitikus szerepére HS⁻ és H₂O₂ reakciójában. Elméleti úton számított reaktáns komplexek (RC), átmeneti állapotok (TS) és termék komplexek (PC) elhelyezkedése a potenciális energia hiperfelületen a nemkatalizált redukcióban illetve a guanidium, HF és H₂O által katalizált reakciókban. A H-kötéseket *szaggatott vonalak*, míg az S_N2 átmeneti állapot részleges kötéseit *párhuzamos szaggatott és folytonos vonalak* jelzik. A guanidium katalizálta reakcióknál a számolt aktiválási paraméterek és ezek alapján becsült sebességi állandók nagyságrendi növekedései (a nemkatalizált reakcióúthoz képest) is fel vannak tüntetve (pirossal). Az atomok színezése nagyrészt a CPK konvenciót követi, attól néhány ponton tér csak el. *Fehér*: H; *szürke*: C; *sötétkék*: N; *vörös*: O; *világoskék*: F; *sárga*: S.^{C21}

Kísérleti eredményeinknek nem csupán az a biológiai jelentősége, hogy rávilágítanak a Prx fehérjék katalitikus aktivitásának molekuláris mechanizmusára, hanem a javasolt effektusok általános érvényűek lehetnek, ami egyéb fehérje tiolok reaktivitásának a becslésében is segítséget nyújthat. Modellünk eltér a Karplus által javasolt mechanizmustól, amit szerkezeti információk feldolgozása alapján (kinetikai mérések nélkül) állítottak fel^{85, ⁸⁶. Az ő modelljükben az ArgI szerepe hasonló az általunk javasolthoz, de az általuk vélt peroxid orientációjából adódóan az ArgII aminosavaknak nem javasoltak kulcsszerepet a peroxid aktiválásában. Szerintük az ArgII szerepe korlátozódik az ArgI megfelelő pozícióban tartására a két Arg közötti Glu-val alkotott H-hidak segítségével. Ezzel ellentétben a következő kísérleti eredményeink az ArgII-nek katalitikus és nem csupán strukturális funkciót betöltő szerepét támasztják alá:}

 - a CD spektroszkópiai és termikus stabilitás analízis vizsgálatok arra utalnak, hogy az általunk generált pontmutánsok másodlagos szerkezetei nem mutatnak lényeges eltérést a vad típusétól.

- dupla mutánsok esetén (melyekben mindkét Arg-ot kicseréltük) a szimpla Arg mutánsokhoz képest további két nagyságrendnyi sebességcsökkenést tapasztaltunk.

-az elméleti számolásaink eredményei szerint mindkét Arg-nak katalitikus funkciója van.

A Prx fehérjék rendkívüli reaktivitásának biológiai jelentőségére vonatkozó kinetikai modellezést végeztünk^{*B*2}. A számolásokban az eddig leggyakrabban leírt oxidációra érzékeny Cys (és a Grx esetén szelenocisztein) fehérjék H₂O₂-dal való reakcióit egy leegyszerűsített sejt citoszolnak megfelelő környezetben (a publikált sejten belüli fehérje koncentrációkat és sebességi állandókat használva) numerikus módszer segítségével szimultán modelleztük. A szimulációk legfontosabb eredményei a következőkben foglalhatók össze:

1) Nagy koncentrációja ellenére a glutation nem túl versenyképes a citoszolban.

2) Nagy reaktivitása és koncentrációja következtében a Prx elsődleges célpontja a H₂O₂-nak.

3) Amíg a Gpx1 és Prx el nem fogynak, addig gyakorlatilag az összes H₂O₂-ot elreagáltatják.

4) A modell alapján a szintén peroxid érzékeny GAPDH és protein tirozin foszfatázok (PTP-

k), kis p K_a -juk ellenére nem vesznek részt a reakciókban amíg a Prx el nem fogy.

Ezek alapján azt valószínűsítettük, hogy a NADPH-oxidázok által termelt H₂O₂-on keresztül zajló redoxijelátviteli folyamatok illetve a peroxid generálta oxidatív stressz által

beindított antioxidáns enzim termelés a Prx oxidációjával elindított reakciókaszkádokon keresztül mennek végbe.



62. ábra H₂O₂ tiolokkal való reakcióinak modellezése egy tipikus sejt citoszolnak megfelelő környezetben. Tiol fehérjékből és glutationból álló keverék oxidációjának modellezése növekvő mennyiségű H₂O₂ jelenlétében. A modellezést Mathematica 5.2 programcsomaggal végeztük. A kompetíciós reakciókat leíró differenciál-egyenletrendszert numerikus integrálással oldottuk meg az Euler-Cauchy módszerrel. Az időbeli lépésközt úgy választottuk meg, hogy az a legnagyobb sebességi állandó reciprokának 1/10-énél kisebb legyen, hogy biztosítsuk az algoritmus elfogadható pontosságát. A modellezés során az irodalomban megtalálható sebességi állandókat és az egyes fehérjék ismert citoplazmabeli koncentrációját alkalmaztuk, úgy, hogy a fehérjék újratermelődését elhanyagoltuk ^{87, B2}

Ezt a közelmúltban, Prof. Geiszt Miklós munkacsoportjával együttműködve kísérletesen is alátámasztottuk. Felhám sejtekben (A432 és HaCaT) megmutattuk, hogy az EGF stimulus következtében termelt H₂O₂-ot, az EGF indukálta kalcium szignál hatására a DUOX1 nevű enzim termeli. Az ilyen endogén úton termelt H₂O₂ a citoszolban található Prx1 és Prx2-vel reagál, amit intakt sejteken belül egy, a laboratóriumomban kidolgozott alkilálási procedúra segítségével igazoltunk. A Prx-ek redukcióját végző Trx oxidációját is mértük. Továbbá a TrxR1 gátlása fokozott Prx oxidációt eredményezett Ca²⁺ szignál hatására (63. ábra). Tulajdonképpen ez a tanulmány az első, amely ismert eredetű endogén úton termelt ROS célpontként azonosította a Prx család két tagját.



63. ábra Duox1 által vezérelt Trx1 és Prx1&2 oxidáció HaCaT sejtekben. (A) A megfelelő siRNA-el kezelt HaCaT sejteket tapsigarginnal (1 µM), ATPγS-el (10 µM) vagy 500 ng/ml EGF-el 5 percig stimuláltuk 37°C-on. A sejteket a stimulációt követően 200 μM of Biotin-PEG11-maleimide (BPM) jelenlétében lizáltuk és a Trx1 oxidációs státuszát Western-blot segítségével vizsgáltuk. A meleimid reagens a Trx1 redukált formájával reagálva mérhető molekulasúly növekedést eredményez az oxidált formához képest. (B) A megfelelő siRNA-el kezelt HaCaT sejteket tapsigarginnal (1 µM) 5 percig stimuláltuk 37 °C-on maid a seiten belüli szabad tiolokat 80 mM metil-metán-tioszulfonát (MMTS) segítségével alkiláltuk. Ezután a sejteket lizáltuk majd a lizátumot Prx1, Prx2 vagy Prx3 Western-blot analízisnek vetettük alá. 30 µM TrxR inhibitorral (DNCB (1-klór-2,4dinitrobenzol)) való kezelés még szembetűnőbb Prx1 oxidációt eredményezett. (C) Tapsigargin kezelés hatására a Prx1 és 2-es formák statisztikailag szignifikánsan (párosított t-teszt) megnövekedett az oxidált forma steady state koncentrációja, amit a Prx3 esetén nem tapasztaltunk (n = 5). (D) Ha 20 µg/ml LPO és 1mM SCN⁻ jelenlétében stimuláltuk a HaCaT sejteket tapisigarginnal, akkor a Trx1 oxidáció nem volt mérhető. Ez arra utal, hogy a Duox1 az extracelluláris térbe termeli a peroxidot (ami azután valószínűleg az aquaporinokon keresztül jut be a sejtbe), mert a peroxidot elnyelő LPO nem képes áthatolni a sejtmembránon.^{C22}

Egy házi készítésű *quench-flow* készülék és a peroxidok tömegspektrometriás módszerrel való detektálásának kidolgozásával a Prx-ek egyéb aminosav, peptid és fehérje peroxidszármazékokkal való reakcióinak a pH = 7-nél való követésére is lehetőségünk nyílt $(64. \, \text{ábra})^{C23}$.



64. ábra Az N-acetil-leucin-hidroperoxid Prx-el való reakciójának kinetikai mérése. (A) A kézi gyártású quench-flow módszer, ahol a reaktánsok keverését a tömegspektrométer léptetőmotorjának segítségével hajtottuk végre az ábrán látható összeállításban. A késleltetési idő változtatását a keverő és a "quench"-oldat közötti cső térfogatának (úthossznak) módosításával értük el. (B) N-acetil-leucin-hidroperoxidot foszfát pufferrel (folytonos vonal) vagy Prx2-vel reagáltattuk a quench-flow készülékben 1,2 s-ig (pontozott vonal) vagy 2,5 s-ig (szaggatott vonal). A reakciót a Prx2 el nem reagált részének 50-szeres feleslegben vett terc-butil-hidroperoxiddal való "quench"-elésével állítottuk le. A maradék N-acetil-leucin-hidroperoxidot a különböző időpillanatokban tömegspektrometriásan kvantitáltuk. A betét ábra hosszabb retenciós idejű csúcs csökkenését mutatja a keverési idő függvényében. A koncentrációkat az alapján határoztuk meg, hogy ez a csúcs a teljes hidroperoxid mennyiség 60%-át képviseli. A másodrendű sebességi állandót a pontokra illesztett egyenes meredekségéből határoztuk meg, felhasználva a reaktánsok kezdeti koncentrációit. Az érzékenység maximalizálása érdekében az LC/MS kromatogramokat szelektív ion módban vettük fel, az m/z=205-207 tartományban, hogy detektáljuk a 206 m/z értékű N-acetil-leucin-hidroperoxidot, de a reakcióelegyben lévő többi részecskét ne lássuk a kromatogramban. A teljes ionáram kromatogramban az el nem reagált N-acetil-leucinhidroperoxid csúcsa volt a domináns, 14,2 perces retenciós idővel. A 12 perc retenciós idejű csúcs szintén 206 m/z értékű csúcs a reakcióelegyünkből, amelynek a fragmentációs spektruma eltér az N-acetil-leucin-hidroperoxidétól. Ez a csúcs valamennyi mintánkban jelen volt és a területe a reakció ideje alatt nem változott.^{C23}

A mért sebességi állandók (5. táblázat) alapján a Prx fehérjecsalád valódi peroxidázokat foglal magában, amelyek, szemben egyéb oxidálószerekkel, kimagasló specificitással redukálják a vizsgált peroxidszármazékokat.

	Prx2	Prx3
Lizozim-hidroperoxid	40	90
BSA-hidroperoxid	160	360
Hisztidin-hidroperoxid	2×10^{3}	3×10^{3}
N-acetil-leucin-hidroperoxid	4×10^4	Nem mért

5. táblázat Hidroperoxid származékok Prx-okkal lejátszódó reakcióinak látszólagos másodrendű sebességi állandói pH = 7,4-en ($M^{-1}s^{-1}$ -ben megadva).

Igazoltuk továbbá, hogy a vörösvértestekben lévő Prx2 lényegesen hatékonyabban közömbösíti az aminosav-, peptid- és fehérje- peroxidokat a glutation–glutation-peroxidáz rendszerhez képest (65. ábra).



65. ábra *Felső panel*: Prx2 és GSH oxidációja vörösvértestekben N-acetil-leucin-metilészter-hidroperoxiddal. Izolált humán vörösvértesteket (10^8 sejt/ml PBS) azonos térfogatú γ -besugárzott (peroxidszármazékot tartalmazó) vagy nem besugárzott N-acetil-leucin metilészterrel elegyítettünk. (A) Prx2 Western-blot vörösvértestekből. 1. sáv: a legnagyobb 110

µM peroxidnak megfelelő besugárzott aminosavoldattal megegyező koncentrációjú nem besugárzott N-acetil-leucin-metil-észter kontroll; 2-5. sáv: N-acetil-leucin-metil-észterhidroperoxid (rendre 11, 22, 55 és 110 µM, peroxid-ekvivalensben). A monomer (redukált) és dimer (oxidált) Prx2 sávokat jelöltük. A kezeléseket 200 mM NEM hozzáadásával állítottuk le, ami a sejtek lizálódása előtt alkilálja a szabad tiolcsoportokat ezáltal lehetőséget nyújtva arra, hogy az intracelluláris oxidált/redukált arányt "befagyasszuk". (B) Prx2 és GSH relatív oxidációi az N-acetil-leucin-metil-észter-hidroperoxid koncentráció függvényében izolált vörösvértestekben (a hibasávok két párhuzamos kísérlet szórásait Alsó panel: Prx2 és GSH oxidációja vörösvértest lizátumban BSA mutatják). hidroperoxiddal. A vörösvértest lizátumokat BSA hidroperoxiddal kezeltük 15 percig. Az eredmények két kísérlet átlagai a GSH, és 4 kísérlet átlagai a Prx2 esetében. A kezeletlen lizátumokban a redukált Prx2 aránya a teljes Prx2 mennyiséghez képest 67 ± 6 %. A lizátum nem besugárzott BSA-oldattal való kezelése után a redukált Prx2 arányában nem tapasztaltunk változást, még a legtöményebb BSA-hidroperoxid-oldatnak megfelelő BSAkoncentrációnál sem.^{C23}

Hasonló aminosav-peroxid-származékok nagy mennyiségben képződnek sejteken belül oxidatív stressz hatására^{66, 88-90}. Eredményeink arra utalnak, hogy a Prx fehérjecsalád ezen peroxid-származékok közömbösítésében is kulcsszerepet játszik.

A vörösvértestekben vizsgáltuk a Prx fehérjéknek a kemoterápiás szerként használt doxorubicin (Dox) által generált oxidatív stressz ellensúlyozásában betöltött szerepét is (nem publikált eredmények). A doxorubicin egy antraciklin származék (66.A. ábra), amely a vörösvértestekben oxi-hemoglobinnal való reakció révén hidrogén-peroxidot generálhat (66.B. ábra)⁹¹.



66. ábra (A) A doxorubicin molekulaszerkezete. (B) A doxorubicin oxyHb-vel reagálva antraciklin szabadgyök anion és szuperoxid köztitermékeken keresztül H₂O₂ képződéséhez vezet. Az ábrákat Bates és Winterbourn 1982-ben megjelent közleményben⁹¹ publikálták.

Mosott vörösvértestekben vizsgáltuk a Prx2 oxidációját doxorubicin hozzáadására Westernblot analízissel. A 67. ábrán látható, hogy doxorubicines kezelés hatására a Prx2 dózisfüggő oxidációját tapasztaltuk.



doxorubicin 0 0,09 0,45 0,9 4,5 9 45 90 µg/ml 67. ábra A mosott vörösvértesteken (vvt) belüli Prx2 oxidációjának követése növekvő doxorubicin koncentráció hatására 4 órás inkubálást követően. A fehérjéket SDS-PAGE gél-elektroforézissel választottuk el nemredukáló közegben. A Prx2 oxidált (dimer) és redukált (monomer) formáit WB analízis segítségével jelenítettük meg. További technikai részletek a Peskin és társszerzői 2010 közleményben^{C23} olvashatók. A kezelést humán vérből izolált 2×10^8 vvt/ml koncentrációjú vörösvértest PBS pufferes oldatán végeztük. Az ábra 7 független kísérlet (különböző vérből kiindulva) reprezentatív eredményét mutatja.

A Prx2 oxidációja relatíve gyorsan, az infúziós kezelés idejéhez mérhető pár órás időskálán lejátszódott.



Doxorubicin hatására a vörösvértestekben lévő GSH is oxidálódik. A GSH oxidációja a citoszolon belüli nagy koncentrációja ellenére nem direkt módon, hanem a glutation peroxidáz enzim (Gpx1) katalitikus hatására játszódik le. A 69. ábrán látható, hogy Dox hozzáadására a Prx redukált formája hamarabb elfogy, mint a GSH.



69. ábra Vörösvértestek Prx2 és GSH állományának doxorubicin kezelés hatására mért relatív oxidációja a (A) Dox koncentráció (4 óra inkubáció) és (B) az idő ([Dox] = 90 μg/ml) függvényében. Az intracelluláris GSH szinteket HPLC-s elválasztás után monobromobimánnal való derivatizációt követve fluoreszcens detektálással végeztük a ⁹² közleményben ismertetett metodika szerint. Az intracelluláris Prx2 oxidáltsági fokának mérése és a kísérleti körülmények megegyeznek a 67. ábrafeliratban leírtakkal. Az adatpontok és hibasávok 3 független kísérlet (különböző vérből kiindulva) átlagát és szórását mutatják.

Az oxidált Prx redukcióját a tioredoxin fehérje a tioredoxin reduktáz (TrxR) enzimmel csatolva végzi, ahogy azt a 16. séma is mutatja. A TrxR egy szelenocisztein tartalmú fehérje, ami munkáját NADPH vagy NADH felhasználása útján végzi (részleteket a fehérje működéséről lásd később).



16. séma A Prx fehérjék tioredoxin rendszer által vezérelt redukciós mechanizmusa. A Prx oxidált (dimer) formáját a *tioredoxin* redukálja vissza az aktív monomerré. A Trx redukcióját a *tioredoxin reduktáz* (TrxR) NADPH segítségével végzi. Glükóz jelenlétében a NADPH utánpótlásról a *glükóz-6-foszfát dehidrogenáz* (G6PD) gondoskodik.

Ezen Prx regeneráló mechanizmus effektivitását vizsgáltuk a mosott vvt-khez való glükóz hozzáadásával, ami a NADPH utánpótlást biztosítja a sejtek számára a *glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz* enzim (G6PD) segítségével. A 70. ábrán jól látható, hogy glükóz jelenlétében a sejten belüli Prx redukció effektíven működik.



70. ábra 90 μg/ml Doxorubicin hatására bekövetkező Prx oxidáció glükóz jelenlétében és távollétében. A kísérleti körülmények megegyeznek a 67. ábrafeliratban leírtakkal. Az ábra 3 független kísérlet (különböző vérből kiindulva) reprezentatív eredményét mutatja.

A teljes vérben a 70. ábrának megfelelő mennyiségű glükóz is jelen van. Ezért a Dox által termelt H₂O₂ Prx-et oxidáló hatását vérben a TrxR gátlásán keresztül tanulmányoztuk. A TrxR működése blokkolható 1-klór-2,4-dinitrobenzol (DNCB) hozzáadásával^{93, 94}. Ilyen körülmények között a Prx lassú oxidációja figyelhető meg a hemoglobin autooxidációjakor képződő H₂O₂ hatására (lásd 71. ábra⁹³). Doxorubicin hozzáadására a kontrollhoz képest a Prx2 gyorsabb oxidációja volt megfigyelhető (71. ábra) ami arra utal, hogy a gyógyszer teljes vérben is a mosott vvt-knél tapasztalt oxidatív stresszt generál a vörösvértestekben.



71. ábra Dox indukálta Prx oxidáció teljes vérben. Teljes vérben is megfigyelhető a doxorubicin hatására bekövetkező Prx oxidáció a redukáló rendszert blokkoló DNCB jelenlétében. A kísérleteket frissen levett humán vérben hajtottuk végre, DNCB és Dox koncentrációk az ábrán feltüntetve.

Vizsgáltuk a doxorubicin hatására bekövetkező hemoglobin oxidációt is. A 72. ábrán jól látható, hogy a hemoglobin oxidáció a Prx2 fogyásával párhuzamosan történik, ami arra



utal, hogy a Prx2-nek fontos szerepe lehet a hemoglobinok oxidatív stressz elleni védelmében.

72. ábra A Prx és a hemoglobin oxidációja mosott vvt-ekben növekvő doxorubicin koncentráció hatására. Az oxidált Hb koncentrációkat spektrofotometriásan határoztuk meg Winterbourn 1990-ben megjelent közleményben⁹⁵ leírtak szerint. Az intracelluláris Prx2 oxidáltsági fokának mérése és a kísérleti körülmények megegyeznek a 67. ábrafeliratban leírtakkal. Az adatpontok és hibasávok 3 független kísérlet (különböző vérből kiindulva) átlagát és szórását mutatják.

Kísérletesen bizonyítottuk tehát, hogy doxorubicin hatására a vvt-ekben jelentős oxidatív terhelés figyelhető meg. A Prx2, H₂O₂-ra való nagy specificitását figyelembe véve azt javasoljuk, hogy a sejtek oxidatív terhelése javarészt H₂O₂ képződésének tulajdonítható. Azon észlelésünk, hogy a Prx2-nek fontos szerepe lehet a hemoglobin oxidációjának védelmében, magyarázatul szolgálhat a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD) deficiens betegeknél (ami a humán populációban a leggyakoribb enzimhiányos betegség) doxorubicines kezelés következtében tapasztalt methemoglobénia és anémia kialakulására⁹⁶. G6PD hiányában ugyanis kevés NADPH termelődik, ami a Trx redukáló rendszer motorja.

A glikolízisben nagy jelentősége van a GAPDH enzimnek is, ami szintén redoxifolyamatok által regulált. A glikolítikus aktivitásáért felelős Cys152 aminosav oxidációja mintegy redoxikapcsolóként viselkedik, mert ez gátolja az enzim glikolitikus aktivitását. A GAPDH Cys152 H₂O₂-dal való reaktivitása a szabad Cys és a Prx-ek CyS_p-i között helyezkedik el ($k = 10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ^{87, 97, 98}. Ez az érték, bár nem közelít a tiolperoxidázok reaktivitásához, sok más redoxireakciók álatl vezérelt Cys fehérje (mint például a PTP1b vagy a Cdc25B) reaktivitásánál nagyságrendekkel nagyobb. A GAPDH citoszolban mért ~250 µM koncentrációját (ami tetramer fehérje lévén 1 mM aktív centrumban lévő Cys152 koncentrációnak felel meg) figyelembe véve feltételezhető, hogy oxidatív stressz esetén, amikor a tiol-peroxidázok már nem győznek a nagy mennyiségű peroxiddal, a GAPDH H₂O₂ általi direkt oxidációja is lejátszódhat. Ezzel összhangban redoxiproteomikai

vizsgálatok H₂O₂-dal kezelt Jurkat sejtekben a GAPDH oxidációját mérték legmeghatározóbbnak a tiol-peroxidázok után⁹⁹.

Prof. Tobias Dick munkacsoportjával együttműködve kinetikai és mechanisztikus vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan, hogy a GAPDH aktív centrumában is létezik-e egy a Prx-hez hasonló katalitikus modell, ami a Cys152 megnövekedett peroxid reaktivitásáért felelős^{C24}. Összetett kinetikai és enzimkinetikai mérések eredményeképp igazoltuk, hogy a Prx-eknél az ArgI szerepét a H179 aminosav tölti be és az ArgII-höz hasonlóan a C156-Y314-T177-T153 aminosav komponensek mentén kialakuló H-híd kötésrendszer a 73. ábrán látható mechanizmus mentén aktiválja az aktív centrumban kötött H₂O₂-ot és segíti az OH⁻ távozását annak részleges protonálásán keresztül.



73. ábra C152 H₂O₂-os oxidációjának elméleti számítások alapján javasolt mechanizmusa. *Balra fent:* Dokkolásos és QM módszerekkel végzett számítások alapján a H₂O₂ javasolt kötőhelye enyhén konkáv, amelyet a C152 tiolát S_γ-atomja, a T153 γ -OHcsoportja és az NH-152 és NH-153 amid nitrogének alkotnak. *Jobbra fent:* Amikor egy H₂O₂-molekula elfoglalja a kötőhelyet, akkor az Y314 és T153 egységek közötti hidrogénkötés kiterjed a H₂O₂ egyik oxigénatomjára is. *Lent:* A javasolt reakciómechanizmus. A nukleofil szubsztitúcióhoz a távozó hidroxidion protonálódása társul a T153 közreműködésével. Ezzel párhuzamosan/másfelől a T153 az Y314 által reprotonálódik. A

protonszállítási lépések teljes rendszere a Peralta és társszerzői 2015-ös közleményében található^{C24}.

Mivel a GAPDH Prx-hez hasonló dimerizációja a C152 sztérikus gátlása miatt gátolt, a peroxiddal való reakcióban képződő C152 szulfénsavszármazék relatíve stabilis. Ezért a GAPDH peroxiddal való reakcióját (többek közt) a CySOH keletkezésének detektálásával dimedonnal való adduktum képzésén keresztül tudtuk követni. A dimedonnal blokkolt szulfénsavszármazékot egy dimedon ellenes antitest segítségével detektáltuk. Összetett kinetikai vizsgálataink és numerikus úton történő kinetikai szimulációk segítségével igazoltuk, hogy a 73. ábrán látható proton-relé utolsó tagját, a C156-ot, más aminosavra kicserélve a mutáns C156S és C156A GAPDH származékok H₂O₂-dal való reaktivitása legalább egy nagyságrenddel csökkent (74. ábra).



74. ábra A C156 kicserélése nem befolyásolja a glikolitikus aktivitást, de lelassítja a C152 H_2O_2 általi oxidációját. (A) A függőleges tengelyen a WT enzim és az egyes pontmutánsok kezdeti sebességek módszerével meghatározott glikolitikus aktivitásainak aránya látható a vad típusú enzim aktivitásához képest. (B) WT és C156S GAPDH relatív reaktivitása H_2O_2 -os oxidációval szemben. A Cys-szulfénsav termék képződését dimedonos jelölés segítségével követtük. A megfigyelt másodrendű sebességi állandók arányát a kísérleti pontok exponenciális görbével való illesztéséből kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandókból határoztuk meg, figyelembe véve a hozzáadott H_2O_2 koncentrációját. (C) C152-szulfénsav képződésének időbeli követése (normált skálán) 400 μ M H_2O_2

hozzáadása után (kék rombuszok). A reakciót dimedonos származékképzést követő antidimedon immunoblot módszerrel követtük. A kísérleti adatpontok jól illeszthetők exponenciális görbével két különböző kinetikai modell alapján is (piros és kék folytonos vonalak). A Model 1 (piros vonal) a GAPDH és a H₂O₂ közötti, GAPDH-SOH képződéséhez vezető bimolekuláris reakció mellett (k_1) tartalmazza még a GAPDH-SOH továbbalakulását egy második H_2O_2 (k_2) és a dimedon (k_3) közötti kompetícióban. A Model 2 (kék vonal) segítségével a maradék DTT hatását szeretnénk szemléltetni. A GAPDH előredukciójához 1 mM DTT-t használtunk, ennek a sómentesítés útján történő eltávolítása után az eredeti mennyiség mintegy <1%-a marad az oldatban (becslés alapján). Az ottmaradó DTT képes visszaredukálni a GAPDH-SOH terméket –SH formába (k4), ezzel korlátozva a k1 állandó értékének pontos meghatározását. A k4 értékeként a szabad Cys-SOH és CySH közötti reakció korábban közölt^{C8} minimális sebességi állandójának 50%-át használva ($k_4 = 5 \times 10^4$ $M^{-1}s^{-1}$) azt tapasztaltuk, hogy a Model 2-ből a k_1 állandónak egy nagyságrenddel nagyobb értéke származik (t.i. 300 M⁻¹s⁻¹), mint a Model 1-ből. (D) A peroxidfelesleg mellett szimulált k_{obs} pseudo elsőrendű sebességi állandók (a k_1 -hez rendelt reakcióra) mindkét modell alapján számolt értékei lineáris peroxid függést mutattak. A két modell alapján az ábrán feltüntettett sebességi állandó értékek mellett minden peroxidkoncentrációnál igazoltuk a (C) részben mért kinatikai görbéken szemléltetett DTT hatását a k_1 -re.^{C24}

A 73. ábrán látható modellt a GAPDH glutationilációján keresztül, a proton-relé egyéb aminosavjainak kicserélésével és molekuladinamikai valamint kvantummechanikai számolások segítségével is igazoltuk. Rendkívül fontos az az eredmény, hogy a proton-relé tagjait kicserélve a C152 glikolitikus aktivitása nem sérült (74.A. ábra). Ez arra utal, hogy a C152 glikolitikus és peroxidáz funkciói, bár ugyanazon C152 mint nukleofil ágens direkt reakcióján keresztül zajlik, egymástól elkülöníthető mechanizmusok segítségével, különböző aminosav komponensek részvételével játszódik le. Az oxidációra érzéketlen, de glikolitikus aktivitásukat 100%-ban megőrző C156S és Y314F GAPDH származékok élesztő sejtekben való expresszálása lehetőséget nyújtott arra, hogy vizsgáljuk a GAPDH oxidációra való érzékenységének biológiai szerepét oxidatív stressz jelenlétében. A vad típust és az oxidációra érzéketlen GAPDH mutánsokat expresszáló élesztő sejtvonalak megegyező növekedési görbék mentén szaporodtak (75.B. ábra). A mutáns sejtvonal azonban kevésbé bizonyult ellenállónak oxidatív stresszel szemben és peroxid jelenlétében szignifikánsan nagyobb mértékű sejtpusztulás volt detektálható a vad típushoz képest (75.C. ábra). Irodalmi adatok alapján és annak fényében, hogy a mutáns GAPDH-kat expresszáló sejtek kevesebb, míg a vad típusú sejtek több NADPH-t termeltek peroxid stressz hatására, mint a kontroll sejtek (75.D. ábra), a 75.A. ábrán látható modellt javasoltuk a GAPDH oxidációra való érzékenységének magyarázatára. A modell alapján a GAPDH-ban működő redoxikapcsoló akkor lép életbe, amikor a tiol peroxidázok Trx/TrxR/NADPH rendszer által való visszaredukálása a NADPH fogyása miatt nem győzi a peroxid terhelést. (Ez összhangban van a GAPDH C152 köztes peroxid reaktivitásával is.) Ebben az esetben a GAPDH C152 a H₂O₂-dal való közvetlen reakcióban inaktiválja az enzim glikolitikus aktivitását, ami a GAPDH szubsztrátjának, a G3P-nek, a felhalmozódásán keresztül aktiválja a pentóz-foszfát ciklust. A pentóz-foszfát ciklusban a G6PD enzim segítségével fokozódik a NADPH termelés, ami a Prx rendszer aktiválásán keresztül segíti a sejt peroxid elleni védekezését.



75. ábra A GAPDH oxidációra való érzékenysége hozzájárul a sejtek oxidatív stressz elleni védekezéséhez. (A) Az oxidatív stresszhez való alkalmazkodás folyamatának magyarázata. H₂O₂ hosszas jelenlétében diszulfidok képződnek az érintett fehérjékből és a glutationból. Az idő előrehaladtával a csökkenő NADPH szint miatt a sejt H₂O₂-bontó kapacitása csökken, így megnő a H₂O₂ szintje, ami a GAPDH inaktivációjához vezet. Ezzel a glikolízis aránya csökken a pentóz foszfát útvonal javára, amely NADP⁺-ból NADPH-t termel. Az így újratermelődő NADPH pedig a diszulfidokat redukciójáért felelős glutation és tioredoxin rendszerek "üzemanyaga". (B) Vad típusú illetve mutáns GAPDH-t expresszáló élesztő törzsek glikolitikus körülmények között azonos növekedési kinetikát mutatnak. A növekedési görbék olyan élesztőtörzseket reprezentálnak, amelyek WT, C156S illetve Y314F GAPDH pontmutánsokat expresszálnak. A feltüntetett pontok és hibasávok 3 mérés átlagai \pm szórásai. (C) WT GAPDH-t expresszáló élesztő törzseknek 1 órás H₂O₂-dal való kezelés után nagyobb a túlélési aránya, mint a C156S vagy Y314F mutánsokat termelőké. A feltüntetett pontok és hibasávok 3 mérés átlagai \pm szórásai, **P<0,01. (D) H₂O₂ -os kezelés után a WT GAPDH-t termelő élesztőtörzsekben megnő a NADPH/NADP⁺ arány, míg a mutáns törzsek esetében csökken. A NADPH/NADP⁺ arány meghatározása 2 mM H₂O₂ hozzáadása előtt és után történt. A feltüntetett pontok és hibasávok 3 mérés átlagai ± szórásai, *P<0,05.^{C24}

Extrém oxidatív stressz hatására, amikor már a GAPDH inaktiváció által indukált extra NADPH termelés sem elég a peroxid roncsoló hatásának kivédésére, a sejtek programozott sejthalállal (apoptózis) reagálnak¹⁰⁰. Előzőleg bemutatták, hogy a p53 reaktiváló RITA nevű antitumor szer ilyen extrém oxidatív stressz generálása révén pusztítja a daganatos sejteket^{101, 102}. A sejthalállal összefüggésbe volt hozható a TrxR1 fehérje (amely többek közt a Prx-ek reaktiválását végző a Trx redukciójáért felelős; lásd 16. séma) dimerizációja (a TrxR1 monomer molekula tömege 55 kDa a dimeré pedig 110 kDa)¹⁰³. A dimer nem volt redukálható denaturáló/redukáló (SDS-PAGE/DTT) környezetben, ami arra utal, hogy nem diszulfid híd köti össze a monomereket. HCT116 sejtekben az oxidatív stressz szerepét ezekben a folyamatokban alátámasztottuk azáltal, hogy a RITA által okozott sejthalált és a TrxR1 dimerizációt gátolta az NDGA nevű antioxidáns/gyökfogó, de nem vagy lényegesen kisebb mértékben gátolta a *lipoxigenáz* inhibitor BW-A-4c, a *foszfolipáz A*₂ inhibitor MAFP vagy DEDA, a *ciklooxigenáz* inhibitor indometacin, és az aldehid fogó piridoxamin vagy szalicilamin (76. ábra).



76. ábra RITA kezelés elősegíti a kovalensen kötődő inaktív TrxR1 oligomerek képződését rákos sejtekben. Az oligomerizáció NDGA-val megelőzhető és a sejthalállal is

összefügg. (A) HCT116 sejtek RITA kezelése elindítja egy ≈110 kDa molekulatömegű TrxR1-re pozitív jelet adó sáv képződését a Western-blot analízis során.¹⁰⁴ A TrxR1 fehérjéket immunprecipitáció segítségével tisztítottuk HCT116 sejtekből (RITA kezelés nélkül vagy amellett, a jelzettek szerint), Coomassie festékkel színeztük, majd triptikus emésztést követően tömegspektrometriásan elemeztük. HCT116 sejtek NDGA-val történő előkezelése megakadályozza a RITA által kiváltott TrxR1 dimer sáv képződését. Az eredményt megerősítettük a siRNA (Siseq1 és Siseq2) segítségével TrxR1 knockdown sejtekkel is. A Western-blotok alatt a dimer/monomer arányok láthatók, amelyeket denzitometriás kiértékelés alapján számítottunk. (D) Az NDGA kezelés megelőzi a RITA által kiváltott sejthalált HCT116 sejtekben. A részleteket ld. a szövegben és a Xu és társszerzői 2015 közleményben^{C25}.

Sikerült megmutatni, hogy az oxidatív stressz hatására a TrxR1 felszínén lévő konzervált Trp114 könnyen oxidálódik. A dimer egykristály röntgendiffrakciós szerkezetének vizsgálatával azt is sikerült igazolni, hogy a dimerizáció két oxidált Trp114 forma összekapcsolásán keresztül valósul meg (77. ábra). Mivel azonban a Trp oxidáció kémiája nagyon bonyolult és a keletkező termékek széles skálán mozognak¹⁰⁵, sajnos nem tudtuk a két Trp114 oxidatív módosulatát és a köztük lévő kötés kémiai jellegét azonosítani.



77. ábra A fehérje felszínén elhelyezkedő Trp114 egység kapcsolja össze a nemredukálható TrxR1 dimereket (melyek két könnyen széteső dimer tetramerjeként vannak jelen a sejtben). (A) TrxR1 tetramer (két Coulomb kölcsönhatással egybentartott dimer kovalens kötéssel összekötve) kristályszerkezete. A két dimer (sárga/rózsaszín és zöld/kék) a két módosult Trp114 kölcsönhatása által kapcsolódik össze. Az érintett Trp egységek itt a módosított oldalláncukkal szerepelnek, és középen találhatók, a sárga és a kék alegységek közötti felületen. (B) Közelkép az elektronsűrűség-térképnek arról a régiójáról, ahol a két módosított Trp114 oldallánc tetramerré kapcsolja össze a két dimer alegységet (a dimerek itt zöld és sárga színnel vannak jelölve). A kötésre is kiterjedő elektronsűrűséget a Trp aminosavak semmilyen ismert módosulásával nem tudtuk modellezni, ezért a Trp114 oldalláncok csak elektronsűrűségként szerepelnek. A szomszédos aminosavakat mindkét dimerben hárombetűs kóddal jelöltük.^{C25}

A Trp114 RITA által okozott sejten belüli TrxR1 dimerizációban betöltött fontos szerepét a W114R mutációt hordozó TrxR1 HCT116-ban való expresszálásán keresztül sikerült alátámasztani (78. ábra).



78. ábra A RITA által indukált TrxR1 oligomerizáció HCT116 sejtekben a Trp114 oxidációján keresztül megy végbe. Különböző TrxR1 módosulatok immunoblot analízise TrxR1 ellenes (fent) vagy FLAG-tag ellenes (lent) antitestek segítségével. A HCT116 sejtlizátumokból származó fehérjéket redukáló SDS-PAGE géleken választottuk el. FLAG-taggel ellátott WT TrxR1 és W114R mutáns expressziójára transzfektált, valamint nem transzfektált kontroll sejteket RITA illetve RITA és NDGA kezelésnek vetettünk alá, továbbá kezeletlen kontroll sejteket is alkalmaztunk.^{C25}

A Trp114 fontos szerepet tölt be a TrxR1 aktivitásában is, amit a Trp aminosavakat specifikusan brómozó *N*-brómszukcinimid (NBS) enzimaktivitást gátló hatásán keresztül mutattunk be (79. ábra).



79. ábra Az NBS irreverzibilisen gátolja a TrxR1 aktivitását. (A) WT dimer TrxR1-et sötétben inkubáltunk a megadott koncentrációjú NBS-sel, majd sómentesítést követően meghatároztuk a TrxR1 aktivitását DTNB-s módszerrel vagy Trx-függő inzulin redukció segítségével. (B) Az oldathoz adott szabad Trp megvédi a TrxR1 enzimet az NBS általi inhibíciótól.^{C25}

A Trp114 katalízisben betöltött szerepét pontmutánsok segítségével, Trx-el csatolt enzimaktivitás méréssel támasztottuk alá (6. táblázat).

	WT	W114F	W114R	W114E	W114G
Trx1 ^a					
<i>k</i> _{cat} (perc)	1130±21	596±8	106±2	< 3	102±1
$K_{\rm m}$ ($\mu { m M}$)	7,9±0.3	6,5±0,2	36,9±1,2	Nem mérhető	37,2±0,9
$k_{\rm cat}/K_{\rm m}$ (perc/ μ M)	144	92	3	Nem mérhető	3

6. táblázat Patkány TrxR1 variánsok steady-state kinetikai paraméterei.

A humán Trx1-el kapcsolt enzimaktivitás méréseket inzulin redukciójának segítségével végeztük.

3D fluoreszcencia spektroszkópia mérések arra utaltak, hogy a Trp114 szerepet játszhat a FAD-dal való kommunikációban, mivel a Trp114 pontmutációjának hatására a FAD-ra jellemző emisszió eltűnt vagy gyengült (80. ábra).



80. ábra A háromdimenziós fluoreszcens spektrumok megmutatják a Trp114 és a FAD közötti kommunikációt. Tipikusan az enzimhez kötött flavin fluoreszcens spektruma $Em_{max} \approx 520$ nm emisszió mellett három gerjesztési csúcsot tartalmaz, $Ex_{max} \approx 280$, 370 és 470 nm hullámhosszaknál. A Trp114 pontmutánsok esetében ezek közül az egyik csúcs gyakorlatilag hiányzott a spektrumból ($Ex_{max} \approx 470$ nm/ $Em_{max} \approx 520$ nm, vastag nyilak), ehelyett egy új csúcs volt detektálható $Ex_{max} \approx 370$ nm/ $Em_{max} \approx 440$ nm paraméterekkel (vékony nyilak)^{C25}.

NADPH jelenlétéban a W114R és a vad típusú TrxR ESR spektrumainak vizsgálata arra utalt, hogy ugyanazon természetű szabadgyökök képződnek a két származékban, ami a hiperfinom csatolási állandók alapján leginkább a flavin szemikinon szabadgyökhöz volt rendelhető¹⁰⁶. Az az észlelés, hogy a W114R TrxR1 ESR jel intenzitása lényegesen nagyobb volt a vad típusénál (81. ábra) a 3D fluoreszcencia spektroszkópiával összhangban arra utal, hogy a Trp114, nagy távolsága ellenére kommunikálhat a FAD kofaktorral, feltehetően intramolekuláris elektrontranszfer útján (magyarul, a W114R mutáns ESR jele azért nagyobb, mert a FAD-ról az elektrontranszfer gátolt).



81. ábra Vad típusú TrxR és W114R módosulat reprezentatív ESR vizsgálata. A spektrumok felvétele előtt a TrxR dimert NADPH-val kezeltük. Sem az oxidált enzimek NADPH távollétében, sem a NADPH enzim távollétében nem mutatták ezeket a jeleket. Az oszlopgrafikon megmutatja a vad típusú enzim (wtTrxR) és a mutáns W114R közötti relatív ESR jelintenzitásokat azokban az esetekben, amikor az enzimeket feleslegben vett NADPH-val redukált (EH4) vagy sztöchiometrikus mennyiségű NADPH-val részlegesen redukált (EH2) formába hoztuk. *P<0,05 és **P<0,01.

Összefoglalva tehát, az eredményeink arra utalnak, hogy extrém oxidáló közeg hatására a sejtekben a redukciós/helyreállító folyamatok kulcsfontosságú enzime, a TrxR1, irreverzibilis módon inaktiválódik, ami a sejtet programozott sejthalálra kényszerítheti. A TrxR1 inaktivációja a Trp114 oxidációján és az oxidált Trp114-en keresztüli dimerizáció útján valósul meg, ami nemcsak az előzőleg javasolt Trx-hez való kötődést¹⁰⁷, hanem az enzim aktivitását is gátolja. A TrxR1 a NADPH által szolgáltatott redukciós ekvivalenseket a FAD csoportjáról (eddig ismeretlen úton) a Trx redukciót végző szelenocisztein aminosav redukciójára fordítja. Kísérleteink arra utalnak, hogy a Trp114 a FAD és a szelenocisztein közti elektrontranszferben játszhat fontos szerepet. Sajnos a feltehetően köztitermékként képződő Trp114 szabadgyököt vagy a Trp114-eken keresztüli dimerizáció kémiai természetét nem sikerült kísérletesen igazolni/karakterizálni.

4.3 A hidrogén-szulfid által vezérelt sejten belüli jelátviteli folyamatok molekuláris mechanizmusai^{C26-C35, B3}

A hidrogén-szulfid, mint fontos sejten belüli folyamatokat vezérlő jelátviteli kismolekula kutatását az Abe és Kimura 1996-os tanulmányának¹² a szulfid idegrendszert szabályozó szerepére való rávilágítása indította el. Mára már elfogadott tény, hogy a szulfid majdnem minden sejttípusban alapvető vezérlő funkciókkal rendelkezik.¹⁶A szulfid által vezérelt jelátviteli folyamatoknak a 3 legelfogadottabb molekuláris mechanizmusa (összefoglalva Nagy Methods in Enzymology 2015^{*B3*}): 1) Funkcionális vagy szabályzó fehérje ciszteintiolok perszulfiddá alakítása (szulfhidrációja).^{14, 19} 2) Metalloenzimek aktivitásának vezérlése a fémcentrummal való koordinációs és/vagy redoxireakciókon keresztül ^{C31,B3}. 3) A nitrogén-monoxid (NO) által vezérelt jelátviteli útvonalak befolyásolása^{108,C34}. Az endogén szulfidot elsősorban transzszulfurációs útvonalakon, a cisztein aminosav metabolizmusa révén 3 enzimatikus folyamat termeli (82. ábra)¹⁰⁹, lebontása pedig a sejtek mitokondriumában történik (84. ábra)¹¹⁰.



82. ábra Az endogén szulfid termelésének 3 fő enzimatikus útvonala. A piridoxál-foszfát kofaktort használó *cisztationin* γ -*liáz* (CSE) és *cisztationin* β -*szintáz* (CBS) közvetlenül, míg a *3-merkaptopiruvát szulfurtanszferáz* (3MST) az *aszpartát/cisztein aminotranszferáz* (AAT) közreműködésével termel az ábrán szemléltetett szubsztrátok jelenlétében szulfidot a Cys metabolizmusa révén.^{B3}



83. ábra A sejtek mitokondriumában a szulfidlebontás oxidatív úton történik. A szulfidkinon-reduktáz (SQR) enzim aktív centrumában lévő intramolekuláris diszulfidcsoportjának redukciója szulfid-kinon-reduktáz-perszulfid (SQR-SSH) köztitermék képződésén keresztül a szulfidot tioszulfáttá oxidálja. A tioszulfátról a szulfán ként a tioszulfát:glutation szulfurtranszferáz (TST) enzim a GSH-ra közvetítve GSSH képződik. A GSSH-t a szulfid-dioxigenáz (SDO) oxigén segítségével szulfittá oxidálja. A szulfittal a szulfit-oxidáz (SO) vagy a SQR reagál, mely reakciókban szulfát vagy tioszulfát képződik.^{B3}

A különböző biológiai rendszerekben mért endogén szulfidkoncentrációk nagyon széles skálán mozognak és a mért értékek hatalmas szórást mutatnak az irodalomban. Egy összefoglaló cikkben^{C26} rávilágítottunk arra, hogy a nagyon eltérő mért értékek a mérési módszerek eltérő kémiai sajátságainak (mint például pH, redukáló oxidáló közeg...) köszönhetően, a biológiai rendszerekben biomolekulákhoz kötött formában lévő szulfid felszabadulásának tulajdonítható. A szabad szulfid mennyisége nagyságrendekkel kisebb a kötött szulfidénál, ami azért fontos, mert a szabad szulfid már 1 µM koncentrációnál gátolja a sejtlégzést a mitokondriális elektrontranszport lánc *Citokróm C oxidáz* enzimén keresztül. Javaslatunk szerint a nagy mennyiségben jelen lévő kötött szulfid viszont fontos szerepet játszhat jelátviteli folyamatokban, ahol mintegy szulfid pufferként viselkedve, az elhasznált szulfid utánpótlását, szabályozott sebességgel és mértékben, biztosíthatja a kötött szulfid szabad szulfid egyensúlyok eltolódásának következtében. Ugyanebben a közleményben összegeztük a szulfid oldatkémiájával kapcsolatos tapasztalatainkat és javaslatot tettünk arra vonatkozóan, hogy hogyan kell helyesen szulfidoldatot készíteni és tárolni. Erre elsősorban azért volt szükség, mert a szulfidoldatok poliszulfid szennyeződései magyarázatul szolgálhatnak az irodalomban található ellentétes észlelések nagy részének^{C26,C27,}. A poliszulfidnak ugyanis nagyon eltérő biológiai hatásai vannak, ami az irodalomban egyre nagyobb figyelmet kap^{111, 112}.

4.3.1 Perszulfidok képződése, lebontása és biológiai szerepe

Tobias Dick munkacsoportjával közösen végzett munkánkban megmutattuk, hogy a *foszfatáz és tenzinhomológ enzim* (PTEN) fehérje aktivitását a szulfidoldatokban nyomokban jelenlévő poliszulfid nagyon hatékonyan gátolja^{C27}. Több oldalról megközelítve sikerült igazolnunk, hogy valóban poliszulfid szennyeződés felelős a szulfidoldatok PTEN

inaktiváló hatásáért és hogy az inaktiváció a PTEN aktív centrumában lévő Cys124 és Cys71 aminosavak perszulfidokká való oxidációjának köszönhető. Intakt HEK293 sejtek szulfiddal való kezelése is inaktiválja az endogén PTEN fehérjét.



F	előredukció	ismétlések száma	mért szulfid (µM) fehérje		sztöchiometriai arány	átlag (± szórás		
PTEN	cloredukció		-DTT	+DTT	(μM)	(szulfid/fehérje)	sztöchiometria)	
	-	1	0	1	20	-	n.a.	
XX/T	VT	1	4	12	17	0,7		
+		2	2	28	15	1,9	1 6±0 67	
	Ŧ	3	4	23	14	1,6	1,0±0,07	
		4	3	30	13	2,3		
C71A	+	1	2	17	20	0,9	0.0±0.10	
	+	2		7	7	1,0	0,9 <u>1</u> 0,10	
C124S	+	1	2,5	11,5	18	0,6	1.0.±0.59	
	+	2	2	22	15	1,5	1,0 ±0,38	

84. ábra Szulfidoldatokban nyomnyi mennyiségben jelenlévő poliszulfid is elég a PTEN aktív centrumában lévő Cys aminosavak szulfhidrációján keresztüli inaktiválására. (A) A PTEN aktivitást nemredukáló közegben mértük az idő függvényében a Greiner és

társszerzői 2013-ban megjelent cikkben^{C27} leírtak szerint. A bal oldali nyíl jelzi a 0-50 µM szulfid hozzáadásának időpontját. A már 5 µM szulfid jelenlétében jelentős PTEN inaktiváció ~20 perccel a szulfid hozzáadását követően DTT redukcióval visszafordítható volt. (B) A PTEN aktivitás mérésére beállított reakció által termelt fluoreszcens termék kvantitálása 50 µM GSSG, GSNO, ONOO⁻, dimetil formamid (ONOO⁻ vak), H₂O₂ vagy NaHS jelenlétében 60 percnél. Adatpontok és hibasávok 2 független mérés (mindkettő n = 3-as mintaszámnál) átlagait és szórását mutatják. (C) A különböző cégektől vásárolt szulfid/biszulfid sókból készített törzsoldatok egymáshoz viszonyított PTEN inaktiváló hatásai (n = 3). (D) és (E) 5 mM NaHS (Cayman) vagy Na₂S, vagy 0.55 mg/ml K₂S_xoldatokat készítettünk 50 mM KCN hozzáadása nélkül (D) vagy hozzáadásával (E) 1 órával a PTEN aktivitás mérés indítása előtt. Ebből az oldatból injektáltunk a reakcióelegybe a nyíllal jelzett időpillanatban annyit, hogy a hígulás után az NaHS/Na₂S-koncentráció 50 µM, a KCN pedig 0 vagy 500 µM legyen. A görbék három párhuzamos mérés átlagát mutatják. (F) Szervetlen poliszulfidokkal való reakcióban generált rekombináns PTEN (WT/C71A/C124S) perszulfid származékokból DTT-vel való redukció után a táblázatban feltüntetett mennyiségű szulfid szabadult fel. rekombináns А szulfhidrált fehérjeszármazékokat gélfiltráció segítségével sótlanítottuk. A sótlanított minták feléhez DTT-t másik feléhez puffert adtunk. A felszabaduló szulfidot monobromobimánnal derivatizáltuk majd a képződő szulfodibimán terméket HPLC-s elválasztás után segítségével kvantitáltuk. fluoreszcensen detektálás А táblázatban feltüntetett sztöchiometria értékeket a redukció után visszamért szulfid és a mért fehérjekoncentrációk arányából számoltuk (n = 3 független mérés).^{C27}

Jelenleg nem világos, hogy ez a hatás a médiumban való szulfid oxidációnak és a poliszulfid sejten belüli sejtmembránon való átlépésének, vagy a sejtmembránon átjutó szulfid sejten belüli poliszulfiddá való oxidációjának tulajdonítható. A szulfid oxidációja sejten belül történhet ROS-okkal való kölcsönhatás révén. A HOCl-val való szulfid oxidáció poliszulfiddá például diffúzió kontrollált sebességű^{C28}. Kiterjedt kinetikai vizsgálataink alapján a reakció mechanizmusára tett javaslatunkat a 39-44. egyenletek írják le.

 $OCl^{-} + H_2O \Longrightarrow HOCl + OH^{-}$ előegyensúly (39)

 $HS^{-} + HOCl \rightarrow HSCl + OH^{-}$ $k_2 = 4.8 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ (40)

$$HS^{-} + OCl^{-} + H^{+} \rightarrow HSCl + OH^{-}$$
 $k_3 = 2,7 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ (41)

$$HSCl + H_2O \rightarrow HSOH + Cl^- + H^+ \qquad gyors \qquad (42)$$

$$HSOH + HS^{-} \rightarrow HS_{2}^{-} + H_{2}O \qquad gyors \qquad (43)$$

Mechanizmus kutatásainkat kiterjesztettük klóramin oxidálószerekre is, amelyek a HOCl fehérje amincsoportjaival való reakcióiban képződik^{113, 114}. A modell klóraminként alkalmazott taurin és glicin monoklóramin-származékok (TauCl és GlyCl) reakcióit

vizsgáltuk szulfiddal. A reakció mindkét esetben poliszulfid képződéshez vezetett szulfid felesleg mellett. A bimolekulás reakció sebessége lényegesen kisebb volt, mint a HOCl esetén (85. ábra).



85. ábra A TauCl és GlyCl szulfiddal való reakcióinak szulfid felesleg mellett mért pszeudo elsőrendű sebességi állandóinak szulfidkoncentráció függése. A mért k_{obs} értékek minimum 5 független kísérlet átlagértékeit és szórását mutatják 1 M ionerősség mellett foszfát pufferrel beállított pH = 7,4-nél. A pirossal bekeretezett, színkóddal jelzett bimolekulás reakcióra vonatkozó látszólagos másodrendű sebességi állandókat az ábrán látható egyenesek illesztéseiből nyertük.

Átfogó kinetikai vizsgálatainknak köszönhetően azonban sikerült a képződő HSSH köztitermék poliszulfidokká való diszproporciójának sebességmeghatározó lépésére egy sebességi állandó becslést tenni pH = 7,4-nél. Az alábbi modell javaslat összhangban van a kinetikai mérések eredményeivel:

$H_2S + R - NHCl \rightarrow HSCl + R - NH_2$	seb.meghat. (k_1)
$\mathrm{HSCl} + \mathrm{H}_2\mathrm{S} \rightarrow \mathrm{HSSH} + \mathrm{HCl}$	gyors
$\mathrm{HSCl} + \mathrm{H_2O} \rightarrow \mathrm{HSOH} + \mathrm{HCl}$	gyors
$\mathrm{HSOH} + \mathrm{H}_2\mathrm{S} \rightarrow \mathrm{HSSH} + \mathrm{H}_2\mathrm{O}$	gyors
$\mathrm{HSSH} + \mathrm{HSSH} \rightarrow \mathrm{HS}_{3}\mathrm{H} + \mathrm{H}_{2}\mathrm{S}$	seb.meghat. (k_2)

 $nHS_2H \rightarrow HS_{(n+1)}H + (n-1)HSH$ (n = 1 - 8)

17. séma A hidrogén-szulfid klóraminokkal való reakciójára javasolt modell.

A szulfid kedvező oxidációs reakciói ellenére azt javasoljuk, hogy a biológiai rendszerekben mért antioxidáns hatások nagy része mégsem a ROS-okkal való közvetlen reakciónak tulajdonítható, amit a szabad szulfid, GSH-hoz és egyéb fehérje tiolokhoz hasonlítotott relatíve kis koncentrációjával magyarázunk^{B3,C26,C28}. Ennek ellenére az endogén szulfid poliszulfiddá alakításában ezek a folyamatok szerepet játszhatnak.

Fehérje perszulfidok nemcsak a tiolok poliszulfidokkal való reakcióin keresztül képződhetnek. Oxidált Cys-származékok is reagálhatnak szabad szulfiddal perszulfid képződés mellett (18. séma).



18. séma. Fehérje Cys perszulfidszármazékok képződésének javasolt lehetséges mechanizmusai. Cys perszulfidok képződhetnek Cys oxidációt követő szulfiddal való reakció (A), diszulfidok szulfiddal való redukciója (B) vagy Cys tiolok poliszulfidokkal való oxidációja (C) révén.^{C26}

A biológiai rendszerekben legnagyobb mennyiségben előforduló oxidált Cys-származékok a Cys-diszulfidok. Ezért vizsgáltuk a diszulfidok szulfiddal való reakcióinak kinetikai és oldategyensúlyi sajátságait^{C29}. A DTNB modell diszulfiddal végzett átfogó kinetikai tanulmányunk megállapította, hogy a reakció relatíve gyors, a hidrogén-szulfid ion nukleofil támadásán keresztül perszulfid és szervetlen poliszulfidok képződését eredményezi. Kinetikai méréseink és szimulációink összhangban vannak az alábbi javasolt mechanizmussal:

RSSR + H₂S
$$\Rightarrow$$
 RSSH + RSH (k₁) (44)
 $k_1^{app} = (8,89 \pm 0,12) \times 10^2 M^{-1} s^{-1}$

RSSH + H₂S
$$\Rightarrow$$
 RSH + HSSH (k_2) (45)
 $k_2^{app} = 5 \times 10^3 - 5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$
nHSSH \Rightarrow HS_(n+1)H + (n - 1)H₂S (n = 1 - 8) (46)

és/vagy

$$RSSH + HS_{n}H \rightleftharpoons RSH + HS_{(n+1)}H$$
(47)

Cisztin és oxidált glutation esetén a reakciók sebességei lényegesen lassabbak. ¹H NMR segítségével végzett egyensúlyi eloszlás méréseink arra utaltak, hogy a perszulfidok mellett dialkil-triszulfid-származékok is képződhetnek és a reakció nincs eltolva a szervetlen poliszulfidok képződésének irányába (ellentétben azzal, amit a DTNB esetén tapasztaltuk). Érdekes egyensúlyi eloszlás szempontjából a DTNB, cisztin és PTEN rendszereket összevetni. Még 10-szeres DTNB felesleg mellett is az oxidációs ekvivalensek gyakorlatilag 100%-ban szervetlen poliszulfidok képződésére fordítódtak. Ezzel ellentétben a nyomokban jelenlévő poliszulfid szennyezés is elegendő volt a PTEN aktív centrumában lévő ciszteinek oxidálására. A szabad cisztin szulfiddal való reakcióiban pedig egyensúlyi elegyek képződését figyelhettük meg. A biológusok számára ezek az eredmények azt a fontos üzenetet hordozzák, hogy a szulfid diszulfidokkal való reakcióinak kinetikai és termodinamikai tulajdonságait nagyban befolyásolják a fehérje diszulfidok és ciszteinek kémiai tulajdonságai. Ennek következtében, adott rendszerben bizonyos reakciók lejátszódása kedvező, másoké kedvezőtlen lesz, amely kémiailag vezérelt biológiai szelektivitásra utal.

Annak ellenére, hogy a Cys-perszulfid képződés egy ma már széles körben elfogadott modellje a szulfid által szabályozott jelátviteli folyamatoknak, a sejten belüli fehérje perszulfidok detektálása nem megoldott. Ezért kifejlesztettünk egy fehérje perszulfid detektálására alkalmas protokollt, amelynek kulcs lépéseit a 86. ábra ismerteti.

102



86. ábra Általunk kidolgozott fehérje perszulfid detektálási módszer (ProPerDP) sematikus ismertetése. A Cys tiol és perszulfid funkciós csoportok EZ-Link Jódacetil-PEG2-biotin hozzáadására alkilálódnak (IAB) а megfelelő tioéter-vagy diszulfidszármazékok képződése közben. Az oxidált egyéb Cys-származékok nem alkilálódnak, vagy részben alkilálódva szintén tioéter-származékokat adnak (Sample 1). Az alkilált tioéter és diszulfidszármazékok streptavidinnel bevont mágneses gyöngyök segítségével szelektíve kinyerhetők a mintából (Sample 2). A gyöngyökről DTT vagy TCEP segítségével az eredetileg perszulfid funkciós csoportokat tartalmazó fehérjék (a derivatizálás következtében diszulfidok) szelektíve redukálhatók (Sample 3). A tioéterként kötött Cys-származékok a SDS-t tartalmazó gél-elektroforézis feltöltő pufferben való forralással távolíthatók el a gyöngyökről (Sample 4).^{C30}

A módszert a humán szérum albumin perszulfidszármazékának detektálásával validáltuk, amit poliszulfiddal való reakció segítségével állítottunk elő. A PTEN ciszteineken való perszulfidképződés detektálására beállított közvetett mérés (amely a tisztított fehérje perszulfid redukciója következtében felszabaduló szulfid derivatizálást majd HPLC-s elválasztást követő fluoreszcens detektálásán alapul) segítségével igazoltuk, hogy a HSA szabad ciszteinje poliszulfiddal reagálva valóban HSA-perszulfid származék képződését eredményezi. Az így készített HSA-perszulfidot az új módszerünk képes kvantitatíve detektálni, poliszulfiddal kezelt humán vérplazmában is (87. ábra).





87. ábra Humán szérum albumin perszulfid detektálása. S1-S4 az 86. ábrának megfelelő mintákra utal. (A) Az IAB-vel alkilált HSA-SSH effektíven eltávolítható streptavidin gyöngyök segítségével (S1 és S2 minták fehérjetartalmának arányából következtetve). Az S3 kútban a gyöngyökről redukcióval eltávolítható HSA-SSH, az S4-ben pedig a lefőzéssel kinyert HSA tiolok láthatók. Az S3 kútban nem volt detektálható jel amikor a HSA-SSH mintákat előredukáltuk. A gél n=9 független kísérletet reprezentál. (A') A HSA-SSH minta 5 mM szulfiddal való 30 perces inkubálásának hatására HSA-SSH csökkenést okoz a 45. reakció egyensúlyának eltolásával (lásd a szövegben). (B) HSA-SSH detektálása poliszulfiddal kezelt plazmában is lehetséges volt, de poliszulfid kezelés hiányában (B') endogén plazma HSA-SSH nem volt mérhető mennyiségben jelen. A gél kolloidális Coomassie kékkel van festve és n=3 kísérletet reprezentál. HSA-SSH detektálása 0-1 mM poliszulfiddal (C) vagy szulfiddal (C') kezelt plazma mintákból WB analízissel csak az S3 mintákat mutatva. 100 ng-nyi plazma fehérjét vagy 20 ng tisztított HSA-t vittünk fel pozitív kontrollként. A blottok n=3 kísérletet reprezentálnak. A géleken és blottokon tapasztalt mobilitásbeli különbségek a redukáló közegben a HSA intramolekuláris diszulfid hidak redukciójának köszönhető, amit a gélekről kivágott sávok tömegspektrometriás analízisével igazoltunk.^{C30}

A fehérje ciszteinek perszulfidokból való sejten belüli regenerációjáért felelős enzim rendszer sem ismeretes, ami a javasolt jelátviteli folyamatok alapfeltétele. Átfogó enzimkinetikai vizsgálatokat végeztünk ezért a tioredoxin rendszer fehérjecsalád szervetlen poliszulfidokat és perszulfidokat redukáló aktivitásaira vonatkozóan. Kísérleteink igazolták, hogy a TrxR1 szelenociszteinjén keresztül katalizálja a poliszulfidok NADPH általi redukcióit (88.A-D. ábra).



88. ábra A Trx rendszer katalitikusan redukálja a szervetlen poliszulfidokat és a fehérje perszulfidokat. (A) Kinetikai görbék 0-100 μ M HS_x⁻ redukciójának időbeli lefutását mutatják 100 nM TrxR1 és 250 μ M NADPH jelenlétében a NADPH fogyását spektrofotometriásan követve (340 nm hullámhossznál). (B) Az (A) ábrán látható kinetikai görbék kezdeti sebességei lineárisan függenek a poliszulfid-koncentrációtól (n = 3). (C) 50
μ M nátrium-szelenit hozzáadása (a nyíllal jelzett időpillanatban) az (A)-nak megfelelő reakcióelegyekhez megnövekedett NADPH fogyási sebességekhez vezetett. (D) A Sec aminosavat nem tartalmazó GCSG TrxR1 pontmutáns inaktív. (E) Fiziológiás 5 μ M Trx1 vagy 2 μ M TRP14 megnövekedett enzimaktivitásokat eredményezett. HS_x⁻ hozzáadására a (F) TrxR1/Trx1 rendszer inzulin redukáló képessége vagy a (G) TrxR1/TRP14 rendszer cisztin redukáló képessége nem gátolt. (H) A kinetikai görbék 170 μ M BSA-SSH katalitikus redukálását mutatják 50 nM TrxR1 és 250 μ M NADPH jelenlétében. A reakciók sebessége tovább nő 5 μ M Trx1 vagy 2 μ M TRP14 hozzáadásával.^{C30}

Trx1 és TRP14 jelenlétében a csatolt enzimatikus folyamatok még erőteljesebb katalitikus hatással bírtak (88.E. ábra). Továbbá, a szervetlen poliszulfidok egyáltalán nem gátolták a csatolt és a TrxR1 enzimaktivitás méréseket, hanem kompetitív szubsztrátként viselkedtek azokban (88.F. ábra). Ez arra utal, hogy a poliszulfid redukció közben képződő perszulfid és perszelenit köztitermékek intramolekuláris redukciója a 19. sémán bemutatott modell alapján (csakúgy mint a fehérje diszulfidok redukciójánál a vegyes diszulfid köztitermékek redukciója) kedvezményezett és nem sebességmeghatározó.



19. séma A NADPH/TrxR1 csatolt TRP14 rendszer javasolt HS_x⁻ redukciós mechanimusa. Az az eredmény, hogy a HS_x^- nem gátolta a TRP14 aktivitását arra utal, hogy a köztitermékként feltehetően képződő Cys43-poliszulfid származék relatíve instabil és gyorsan redukálódik a szomszédos Cys46 nukleofil támadásának köszönhetően, ami $HS_{(x-1)}^-$ és HS⁻ felszabadulásával jár. A Cys43 HS_x^- -nal való reakciója Cys43-SSH és $HS_{(x-1)}^-$ képződés mellett is lejátszódhat ami az intramolekuláris Cys43-Cys46 képződési lépésben HS⁻ felszabadulással jár.

A Trx enzim család a fehérje perszulfidok redukcióit is katalizálja (88.H. ábra). Ezt sejten belül is sikerült igazolnunk. Az új fehérje perszulfid detektálási módszerünk ugyanis eredményesnek bizonyult élő sejteken belüli perszulfid detektálására (89. ábra). A549-es tüdő karcinóma sejtekben detektáltuk az endogén és a poliszulfid kezelés hatására képződő perszulfidokat. legnagyobb mennyiségben fehérje А perszulfidált fehérjéket tömegspektrometria segítségével azonosítottuk (89.C. ábra). Az összes azonosított fehérjének van redoxiaktív cisztein aminosav komponense és ezeknek a fehérjéknek a perszulfidációját már előző tanulmányok is javasolták^{18, 19}. Ennek ellenére módszerünk az első olyan módszer, amelyik képes fehérje perszulfidok detektálására élő sejten belül. Az általunk mért endogén perszulfid koncentráció összhangban van az Ida és munkatársai¹⁸ által javasolt értékkel és nem támasztja alá a citoszol redukáló közegére hivatkozó, közelmúltban javasolt lényegesen kisebb koncentrációkat¹¹⁵.





89. ábra Fehérje perszulfid detektálás sejtekben. (A) Perszulfid detektálás HS_x^- -el kezelt és nem kezelt A549 tüdőkarcinóma sejtlizátumban. (B) Perszulfid detektálás HS_x^- -el kezelt

intakt A549 tüdőkarcinóma sejtekben, ahol az alkilálószer felesleg a lizálás előtt eltávolításra került A gélen a fehérjéket Coomassie festéssel jelenítettük meg. Az S3 kútban számokkal jelzett sávokat kivágás és triptikus emésztés után tömegspektrometriásan analizáltuk. (C) A tömegspektrometriás analízis segítségével azonosított fehérje perszulfid származékok a (B)n jelzett sávokból a feltüntetett számoknak megfelelően. (D) Az endogén perszulfidok alacsony koncentrációjuk miatt csak ezüst festéssel jeleníthetők meg. A gélek n = 3 kísérletet reprezentálnak.^{C30}

A Trx rendszer perszulfid redukáló tulajdonságának tanulmányozására TRP14 és TrxR1 deficiens HEK239 sejtvonalakat készítettünk (90.A. ábra). Ezen sejtvonalakon a fehérje detektálási módszerünk segítségével igazoltuk, hogy a Trx rendszer meghatározó szerepet játszik a sejten belüli perszulfid homeosztázisban az alábbi eredmények alapján:

1) A TrxR1 és TRP14 deficiens sejtekben szignifikánsan alacsonyabb fehérje perszulfid szinteket mértünk a kontrol vad típushoz képest (90.B,C. ábra)

2) Poliszulfid kezelés hatására ~3-szor annyi fehérje perszulfidáció indukáltunk a deficiens sejtekben, mint a kontrollban (90.D. ábra)

3) Toxikus mennyiségű poliszulfid kezelést a vad típusú (kontroll) sejtvonal szignifikánsan jobban tolerálta, mint a TrxR1 deficiens sejtek (90.E. ábra).

Eredményeink arra is utalnak, hogy a perszulfid képződés által lejátszódó szulfidvezérelt jelátviteli folyamatokban a tioredoxin rendszernek meghatározó szerep jut. Ezen belül is kimagasló jelentőséggel bír a Trx fehérjecsalád új tagjaként számon tartott TRP14 fehérje, amelynek a perszulfid redukáló képessége kimagasló. Ezt meghatározó eredménynek tartjuk, mert a TRP14, a Trx1-el ellentétben nem képes fehérje diszulfidokat redukálni és fiziológiás enzim-funkciója máig nem tisztázott. A közelmúltban leírt nitrozotiolok redukciója mellett¹¹⁶ eredményeink arra utalnak, hogy a TRP14 a fehérje egyik alapvető funkciója a szulfhidrációs folyamatok vezérlése.





90. ábra A Trx rendszer alapvető szerepet játszik a sejten belüli perszulfidok homeosztázisában. (A) Western-blot analízis igazolja a transzfektált HEK293 sejtek TRP14 és TrxR1 deficienciáit. GAPDH-t használtunk belső kontrollként. (B) Reprezentatív ezüst festett gél (n=4) mutatja, hogy a TrxR1 és TRP14 deficiens sejtekben több endogén fehérje perszulfid detektálható. (C) A deficiens sejtek megnövekedett perszulfid tartalma statisztikailag szignifikánsnak adódott (p<0.05 a párosított t-teszt alapján; n = 4)). 100% a kontrollban (NC) $1.52 \pm 0.55 \ \mu$ g/mg totál perszulfidált fehérjének felel meg. (D) A sejtek 200 μ M poliszulfiddal való 2 órás kezelése nagyobb mértékű fehérje szulfhidrációt okozott a deficiens sejtekben. (E) Citotoxicitásra beállított SRB módszer¹¹⁷ segítségével igazoltuk, hogy a kontroll sejtek (•) lényegesen kevésbé érzékenyek toxikus mennyiségű poliszulfiddal való kezelésre mint a TrxR1 deficiens sejtek (\circ) (*** p<0.0001 -nek megfelelő statisztikai szignifikanciát jelez a 0.5 és 1 mM poliszulfiddal kezelt mintákban a párosított t-teszt alapján). Adatpontok és hibáik 4 független kísérlet 3 párhuzamosának átlagait és szórását mutatják.^{C30}

4.3.2 A szulfid kölcsönhatása hem-fehérjék vas centrumaival

A Cys aminosavak szulfhidrációja mellett egyes biológiai hatások hátterében a szulfid, metalloenzimek fémcentrumaival való kölcsönhatásai állnak^{118,B3}. Az irodalom leginkább a szulfid hem-fehérjékkel való kölcsönhatásaira összpontosít. A hem-fehérjék Fe^{III} centrumához a szulfid koordinációs kölcsönhatás révén reverzibilisen kötődhet, de egyes esetekben redoxireakció is lejátszódhat, amely a Fe^{III} centrum Fe^{II}-vé való redukciója mellett tiil (HS•) szabadgyök képződéséhez vezet.

Biológiai szempontból jelentős a 4.1.1 és 4.1.2 fejezetben ismertetett MPO enzim hem centrumának szulfiddal való kölcsönhatása, mert mind a szulfidnak mind az MPO-nak fontos szerepet tulajdonítanak gyulladásos és kardiovaszkuláris eredetű betegségek patológiáiban. Az MPO, ROS termelés által előidézett, gyulladásserkentő hatásával szemben⁵⁶ a szulfidnak, az antioxidáns tulajdonsága révén gyulladáscsökkentő szerepe van^{119, 120}. Különösen érdekes, hogy míg a szulfid védő hatását írták le reperfúzió okozta szövet károsodás¹²¹, a leukociták endotél sejtekhez való ahéziójának a gátlása¹²², reumatoid artritisz¹²³, neurodegenerációs betegségek¹²⁴ és ateroszklerózis esetén¹²⁰, ugyanezen patológiai folyamatokban az MPO protogonistaként viselkedik¹²⁵⁻¹²⁹. Mindezek fényében célunk az volt, hogy a szulfidnak az MPO enzimatikus reakcióira gyakorolt hatásainak részletes tanulmányozásával betekintést nyerjünk abba, hogy ezeknek a folyamatoknak lehet-e szerepe a szulfid fent említett biológiai viselkedéseiben.

UV-látható spektrofotometria és EPR segítségével igazoltuk, hogy a szulfid gyorsan és nagyon kedvezően reagál az MPO Fe^{III} centrumával (91-92. ábra). A Fe^{III}-hoz való koordináció következtében alacsony spinű Fe^{III}-szulfid komplex képződik, amely egy másik hidrogén-szulfid-molekulával tovább reagál a Fe^{III} centrum Fe^{II}-vé redukálása útján Fe^{II}-szulfid képződése mellett (91. ábra). A Fe^{II}-szulfid komplex képződésre indirekt módon utal a 92. ábrán látható EPR jel csökkenése nagyobb szulfidkoncentrációknál (hiszen a Fe^{II} komplex EPR inaktív).



91. ábra A szulfid reakciói az MPO aktív centrumában lévő vas centrummal. A Fe^{III} centrumhoz előszeretettel koordinálódik a szulfid alacsony spinű Fe^{III}-szulfid képződése közben. Nagyobb szulfidkoncentrációknál egy másik szulfiddal való reakcióban a Fe^{III} centrum redukálódik HS• és Fe^{II}-szulfid komplex képződése mellett.^{*B3*}



92. ábra Szulfid kötődés az MPO aktív centrumában lévő vas centrumhoz. (A) Stoppedflow spektrofotometriával követett spektrális változások 125 μ M szulfid 2 μ M Fe^{III}MPO-val való reakciójában. Az első spektrumot 0,4 másodperccel keverés után rögzítettük, a többit 4,35, 10,0, 15,0, 39,7, 66,5, 100,7 és 250 s időpontokban. A betét egy tipikus kinetikai görbét mutat 625 nm-nél. A kísérletet 100 mM foszfát pufferben, pH 7,4-en és 25°C-on végeztük. (B) 100 μ M MPO mért (folytonos fekete vonalak) és szimulált (piros vonalak) cw EPR spektrumai (a) 0 μ M (b) 440 μ M és (c) 2250 μ M szulfid jelenlétében pH 7,4-en. A spektrumokat T = 10 K-en vettük fel.^{*C31*}

Stopped-flow spektrofotometriás módszer segítségével sikerült a szulfid koordinációját követni az anaerob körülmények közt képzett Fe^{II}-MPO enzimformához is, amely a Fe^{III}-as forma redukciójával kapott UV-látható spektrummal megegyező abszorbancia maximumokat eredményezett (93. ábra) további bizonyítékot szolgáltatva arra, hogy a szulfid és natív Fe^{III}-MPO között lejátszódó, 92. ábrán látható, lassabb reakció terméke valóban a Fe^{II}-szulfid komplex.



93. ábra Stopped-flow kísérletek a szulfid Fe^{II}MPO-val való reakciójára. (A) Stoppedflow-val felvett spektrális változások 2 μ M Fe^{III}MPO 125 μ M szulfiddal való keverését követően 25°C-on 50 mM foszfát pufferben pH = 7,4-nél. Az első spektrumot keverés után 7 ms-mal a többit pedig az ábrán feltüntetett időpillanatokban vettük fel. A vastag fekete vonallal jelzett spektrum a Fe^{II}MPO spektruma, a nyilak az abszorbancia változások irányait jelölik. (B) 474 és 432 nm hullámhosszaknál felvett tipikus kinetikai görbék. A színkóddal ellátott nyilak az (A) ábrán a megfelelő spektrumok felvételeinek időpontjait mutatják. (C) A Fe^{II}MPO (a), Fe^{III}MPO (b), Compound I (c) és Compound II (d) szulfiddal való reakciói után felvett termék spektrumainak összevetése 30,8 s (a), 259 s (b), 1,9 s (c) és 1 s (d) időpontoknál.^{C31}

Enzim kinetikai vizsgálataink rávilágítottak, hogy ezek a kölcsönhatások effektíven gátolják az enzim peroxidáz aktivitását (94. ábra).



94. ábra Az MPO-peroxidáz aktivitásának gátlása szulfid jelenlétében. (A) aktivitásának Reprezentatív ábra az MPO-peroxidáz %-os gátlására növekvő szulfidkoncentrációknál, 30 µM H₂O₂-t használva. (B) A H₂O₂-koncentráció hatása szulfid általi MPO peroxidáz aktivitás 50%-os gátlására. Az adatpontok és hibáik 3 független kísérlet átlagait és szórását mutatják. (C) Reprezentatív Absz változás 652 nm-nél 6 nM MPO peroxidáz aktivitásának, TMB metodikával¹³⁰ végzett követésekor szulfid nélkül (kék vonal) és 1 µM szulfid jelenlétében (piros vonal). 30 µM H₂O₂-ot használva a 1 µM szulfid gátló hatása a reakció végéig mérhető és a kinetikai görbék platója közel megegyező értékre esik, amelyek arra utalnak, hogy valóban a szulfid MPO-peroxidáz aktivitásra gyakorolt hatását, nem pedig a módszerben képződő köztitermékekkel vagy termékekkel való reakcióit mérjük. C31

A maximális MPO aktivitás 50%-os gátlása a peroxidkoncentrációtól függetlenül fiziólógiás (1µM) szulfidkoncentráció mellett volt tapasztalható (94.B. ábra). Kontroll kísérletek sorozata (pl. 94.C. ábra) volt szükséges annak igazolására, hogy a mért hatások nem a szulfidnak az enzim aktivitás mérésre használt módszerrel való interferálásának (termékekkel/köztitermékekkel való reakciója révén) az eredménye. Biológiai szempontból fontos eredmény, hogy az enzim inhibíció reverzibilis, a szulfidkoncentráció csökkenésével az aktivitás gyorsan visszatér az eredeti értékre (95. ábra).



95. ábra Az MPO-peroxidáz aktivitásának szulfifiddal való gátlása reverzibilis. (A) 2 μM MPO és 0 μM (kék vonal), 20 μM (piros vonal), 200 μM (zöld vonal) or 2000 μM (lila vonal) szulfid reakcióelegyeinek 333-szoros hígítása után (ekkor MPO = 6 nM) mért enzim aktivitásai (25°C-on pH 7,4-nél). A szulfid gátló hatása a hígítás utáni szulfidkoncentrációnak felel meg, ami az MPO-szulfid komplex hígítás során való gyors szétesésére utal. (B) Állás hatására a szulfidoldatból való párolgásának megfelelően a mért MPO aktivitás visszatér. (C) MPO compound II szulfiddal való reakciójának spektrális változásai az MPO szoret sávján 30 s (a) és 10 min (b) időpillanatokban. A Compound II-t a Pálinkás és társszerzői cikkben^{C31} leírtak szerint állítottuk elő. (D) A (C) pontban előállított MPO-szulfid komplexet 200 µM H₂O₂-dal reagáltattuk. A 30 s (a), 2 min (b) és 10 min (c) időpontokban felvett spektrumok jól mutatják, hogy a szulfid fogyása (oxidációja) után a compound II forma képződik, ami arra utal, hogy az MPO 100%-ban aktív.^{C31}

A szulfid MPO-ra gyakorolt reverzibilis inhibícióját biológiai környezetben (gyulladt patkány bél homogenátum, patkány és humán neutrofil lizátum) is igazoltuk (96. ábra).



96. ábra Az MPO-peroxidáz aktivitásának gátlása (A) patkány neutrofil lizátumban (B) gyulladt patkány bél homogenátumban és (C) humán neutrofil lizátumban. (A, B) Az MPO aktivitások 7 perccel a szulfid hozzáadása után 300-szoros hígítást követően (HTAB pufferrel) történtek a Bradley és társszerzői cikk¹³¹ alapján 25°C-on pH 7,4-nél. Statisztikai szignifikancia *P < 0.05 esetén ("one-way ANOVA" utáni "Dunnett's teszt"). (C) Az MPO aktivitás %-os gátlása szulfid által humán neutrofil lizátumban hígítás nélkül mérve. Az adatpontok és hibáik 6 független kísérlet átlagát és szórásást mutatják.^{C31}

A szulfidnak nem csak MPO gátló hatása van, hanem az MPO szubsztrátja is lehet. Szekvenciális stopped-flow technika segítségével megmutattuk, hogy a szulfid effektíven redukálja a Compound I és Compound II-es enzimformákat (az enzimformákat a 3. séma mutatja). Szisztematikus kinetikai analízis eredményeképp (97. ábra) meghatároztuk a reakciók másodrendű látszólagos sebességi állandóit pH = 7,4-nél ($k_{\text{CompI}} = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $k_{\text{CompII}} = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) és a méréseinkkel összhangban lévő, 98. ábrán látható modellt javasoltuk.



97. ábra MPO Compound I (bal oldal) és Compound II (jobb oldal) szulfiddal való reakcióinak kinetikája stopped-flow-val követve. Az (A) panelek a Compound I (bal) és a Compound II (jobb) szulfiddal való keverése után felvett spektrális változásokat mutatják. A (B) panelek tipikus mért kinetikai gorbéket (fekete vonal) és a megfelelő egyenlettel való illesztéseket (piros vonal) mutatnak. (C) A Compound I (zöld pontok) és a Compound II (lila pontok) szulfiddal való bimolekuláris reakcióira mért pszeudo elsőrendű sebességi állandók szulfidkoncentráció függései.^{C31}



98. ábra Az MPO különböző enzimformáinak szulfiddal való reakcióira javasolt modell. A pirossal jelzett sebességi állandók általunk mért értékek.^{C31}

Az enzimatikus körfolyamatban a sebességmeghatározó lépés a Fe^{II}-szulfid komplex oldott oxigén általi oxidációja Fe^{III}-szulfid komplexszé (99. ábra).



99. ábra Szulfid jelenléte mellett az MPO katalitikus ciklusában a sebességmeghatározó lépés a Fe^{II}-szulfid komplex oldott oxigén általi oxidációja Fe^{III}-szulfid komplexszé. Reprezentatív kinetikai görbék oxigénnel dúsított (kék vonal) vagy csökkentett oxigén tartalmú (piros vonal) oldatokban 430 nm-nél.^{C31}

Eredményeink tehát alátámasztják azon feltevésünket, hogy a szulfid, gyulladásos folyamatokban észlelt védő hatása (endogén termelt vagy beadott) részben vagy egészében is tulajdonítható az MPO aktivitás gátlásának. Elképzelhető az is, hogy a bélflóra baktériumtörzsei által termelt nagy mennyiségű szulfidnak az MPO gátlásán keresztüli bélfal védő szerepe van. A mért IC⁵⁰ = 1 μ M érték, a vérben mért szulfidkoncentráció fényében arra utal, hogy a keringésben jelen lévő, vagy az endotél sejtekhez kitapadt MPO részben vagy egészében inaktív szulfidkomplex formájában van jelen. Gyulladás esetén a megnövekedett oxidatív stressz hatására a szabad szulfid lokális koncenrációja drasztikusan lecsökkenhet, ami az inaktív MPO-szulfid komplex szétesésén keresztül fokozhatja az oxidatív terhelést és a gyulladásos folyamat káros hatásait (az MPO által termelt erős oxidálószerek roncsoló hatásai révén). További biológiai jelentősége a fent ismertetett eredményeinknek, hogy a szulfid által vezérelt jelátviteli folyamatok egy új molekuláris modelljére világít rá. Az MPO és egyéb metalloenzimek által termelt illetve szabályozott ROS-oknak köztudottan fontos szerepe van a redoxireakciók által vezérelt jelátviteli folyamatokban (lásd 4.2.6 fejezet). A szulfid ezért a metalloenzimek aktivitásainak szabályozásán keresztül ezeket a jelátviteli folyamatokat is befolyásolhatja/vezérelheti. Továbbá, a peroxidáz aktivitás (vagy peroxidáz enzim termelte ROS-ok) általi szulfid oxidáció termékeként képződő poliszulfidok fontos, a szulfidtól nagyon eltérő biológiai funkciókkal rendelkeznek¹¹¹. Mindezek fényében, azzal együtt, hogy a poliszulfidok és egyéb oxidációs termékek nem gátolják az MPO aktivitását (100. ábra), arra következtethetünk, hogy a peroxidáz enzimeknek is reguláló szerepe lehet a szulfid által vezérelt jelátviteli folyamatokban (mint például a 4.3.1 fejezetben ismertetett fehérje Cys szulfhidráció).



100. ábra Poliszulfidok nem gátolják az MPO-peroxidáz aktivitását. Reprezentatív kinetikai görbék 652 nm-nél az MPO-peroxidáz aktivitásának mérésére puffer (kék vonal), 2 μM szulfid (zöld vonal) vagy poliszulfid (piros vonal) hozzáadása után. A peroxidáz aktivitást a TMB módszerrel¹³⁰ 6 nM MPO és 30 μM H₂O₂ koncentráció mellett végeztük pH 7,4-nél.^{C31}

Továbbá, a kimagaslóan oxidáló tulajdonságú Compound I és Compound II-es enzimformák redukálása a szulfid oxidatív stressz ellen nyújtott védőhatására szolgálhat modellként. Egy másik péda arra vonatkozóan, hogy ez nem csak az MPO-rs specifikus mechanizmus, a szulfid ferril-hemoglobinnal való reakciója. A ferril hemoglobin származékok a hemoglobin hemcsoportjának különböző endogén peroxidokkal való reakcióiban képződnek. Ezeknek a ferril-Hb származékoknak a szerkezete, illetve a kémiai tulajdonságai az irodalomban még nem tisztázottak. A peroxidáz enzimekkel ellentétben a Compound I forma esetén a párosítatlan elektron nem a porfirin gyűrűn van delokalizálódva, hanem a fehérjelánc egyéb aminosav komponensein is mértek szabadgyök képződést. Az sem világos, hogy a Compound I és Compound II formáknak megfelelő elektronszerkezet létrejön-e egyáltalán a Hb esetén. Arra vonatkozóan azonban, hogy ezeknek a ferrilszármazékoknak komoly oxidatív stresszt okozó biológiai hatásai vannak, több bizonyíték is van az irodalomban. Balla és munkatársai például meggyőzően bizonyították, hogy a Hb és a Hb-hem csoportjának oxidációja fontos szerepet játszanak az endotél sejtek érzékenyítésén és a monociták endotél sejtekhez való adhéziójának segítése révén az ateroszklerotikus léziók komplikációjában132-134.

Balla József Professzor Úr munkacsoportjával együttműködve vizsgáltuk, a szulfid ateroszklerózisban játszott védő hatásainak molekuláris mechanizmusait. A mi munkánk célkitűzése az volt, hogy felderítsük, hogy a ferril-Hb szulfiddal való redukciója milyen módon járul hozzá a ferril-Hb által okozott oxidatív stressz közömbösítéséhez. A ferril-Hb-t a methemoglobin (metHb, Fe^{III}Hb) illetve az oxyhemoglobin (oxyHb, Fe^{II}Hb) különböző

arányú H₂O₂-dal való reakcióiban generáltuk. Szekvenciális stopped-flow módszer segítségével a képződő ferril-Hb formát a szulfiddal a második keverési ciklusban reagáltattuk és a reakciót több hullámhosszon is követtük. A reakció eredményeképp a látható spektrumban több hullámhosszon is gyors és jelentős spektrális változást figyeltünk meg; 620 nm-nél a szulfhemoglobinra jellemző csúcs megjelenését tapasztaltuk (101.A,B. ábra). Komprehenzív kinetikai vizsgálataink igazolták, hogy a szulfid gyorsan és nagyon effektíven redukálja a ferril-Hb enzim formákat. 406 nm, 425nm és 570 nm hullámhosszaknál két szulfid függő másodrendű reakciót detektáltunk (101.C. ábra).





101. ábra A ferril-Hb származékok gyors szulfid általi redukciója. A metHb (folytonos fekete vonal), a H₂O₂ – metHb reakció elegy termékének 400 s utáni (hosszú szaggatott vonal), és a metHb – H₂O₂ reakcióelegy és a szulfid közötti reakció 60 s utáni (rövid szaggatott vonal) spektrumai a (A) $\lambda = 350-450$ nm és a (B) $\lambda = 500-650$ nm hullámhossz tartományokban. [metHb] = $4,00 \,\mu$ M, [H₂O₂] = $8,00 \,\mu$ M, [szulfid] = $100 \,\mu$ M, [foszfátpuffer] = 20,0 mM, pH = 7,40, t = 25 °C. (A nyílak jelzik a kinetikai vizsgálatokra használt hullámhosszakat: 406 nm, 425 nm, 570 nm.) (C) A metHb – H₂O₂ reakcióelegy és a szulfid közötti reakció tipikus mért kinetikai görbéi és két exponenciális tagot tartalmazó egyenlettel való illesztéseik 406 nm és 425 nm-nél. (D) A (C)-nél bemutatott két exponenciális illesztésekből nyert pszeudo elsőrendű sebességi állandók szulfid függései, melyeket a Hb a és β láncaiba található különböző reaktivitású hem centrumok reakcióihoz rendeltünk (lásd a szövegben). (E) A (D)-nek megfelelő analízis azzal a különbséggel, hogy a ferril Hb formát Fe^{II} centrumokat tartalmazó oxiHb-ből kiindulva állítottuk elő (lásd a szövegben). (F) Tipikus kinetikai görbe 620 nm-nél és a két exponenciális egyenlettel való illesztése az (A) pontnak megfelelő koncentráció viszonyok mellett. 620 nm-nél sokkal gyorsabb reakciósebességeket mértünk mint 406 nm vagy 425 nm-nél (C). (G) A 620 nm-nél mért pszeudo elsőrendű sebességi állandók a 405 nm és 425 nm-nél rögzítettekhez hasonlóan lineáris szulfid függést mutatnak. Az ábrákon látható adatpontok és hibáik 3-9 független kísérlet átlagait és szórását mutatják.^{C32}

Ezek a reakciók az irodalmi előzmények (mint pl a ferril-Hb met-Hb-re való redukciója fenollal)^{135, 136} alapján a hemoglobin alfa- és béta-láncainak különböző reaktivitású hemcsoportjaihoz rendelhetők (101.D. ábra). A szulfid függésből számolt látszólagos másodrendű sebességi állandók értékei: $k_{\alpha} = (1,43 \pm 0,06) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $k_{\beta} = (6,5 \pm 0.2) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Kis peroxid felesleg mellett oxiHb-ből kiindulva is ugyanazt a ferrilHb formát kapjuk mint metHb esetén az alábbi színproporciós lépést tartalmazó modell alapján csak sokkal hosszabb időskálán:

$$Fe^{II}Hb + H_2O_2 \rightarrow Fe^{IV}Hb + H_2O$$
(48)

$$Fe^{II}Hb + Fe^{IV}Hb \rightarrow 2 Fe^{III}Hb$$
 (49)

 $Fe^{III}Hb + H_2O_2 \rightarrow Fe^{IV}Hb^{\bullet +} + H_2O$ (50)

Az oxiHb-ből származtatott ferrilHb szulfiddal való reakciója ugyanolyan kinetikai tulajdonságokat mutatott, mint a metHb-ből kiinduló méréseink (101.E. ábra) ($k_{\alpha} = (1,68 \pm 0,16) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $k_{\beta} = (7,01 \pm 0,81) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ami további bizonyítékot szolgáltat arra, hogy az oxiHb és a metHb peroxiddal való reakcióiban ugyanazon ferrilszármazék képződik.

A szulfhemoglobin képződését a Hb – szulfid rendszerben már 1938-ban leírták¹³⁷, de ennek ellenére a képződés mechanizmusa nem ismert és élesen vitatott¹¹⁸. Ezért a ferrilHb-szulfid reakciót 620 nm hullámhossznál, a szulfHb képződését követve is vizsgáltuk. Meglepő módon a reakció sebessége ezen a hullámhosszon a korábban említett hullámhosszakon mértnél két nagyságrenddel gyorsabbnak bizonyult. Ilyen körülmények között is kétlépéses a folyamat és a sebességi állandó lineárisan függ a szulfidkoncentrációjától. A látszólagos másodrendű sebességi állandókra a következő értékeket számoltuk: ($k_{\alpha} = (1,69 \pm 0,15) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $k_{\beta} = (6,50 \pm 0,33) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Sztöchiometrikus metHb és H_2O_2 reakciójával generált ferril-Hb szulfiddal való UV spektrofotometriás titrálása arra utal, hogy a 600 nm felett és alatt detektálható reakciók nem konszekutív, hanem párhuzamos reakciók (101.C,F. ábra), hiszen a 620 nm-nél mért gyors reakció abszorbancia változása csak 1:0,5 = FerrilHb:szulfid arányig nő (102. ábra), a 425 nm-nél követhető lassabb reakció pedig csak ennél nagyobb szulfid jelenlétében válik detektálhatóvá.



102. ábra A szulfHb képződése és a 425 nm-nél mért 100-szor lassab reakció paralel és nem konszekutív reakciók. A szulfHb képződését 620 nm-nél követve azt tapasztaltuk,

hogy az Abs csak 1:0,5 = FerrilHb:szulfid arányig nő. Az ábrákon látható adatpontok és hibáik 3 független kísérlet átlagait és szórását mutatják.

Kísérleteink jelenlegi állása alapján és az irodalmi adatok híján nem tudjuk, hogy a különböző reakciók mely Hb formákhoz rendelhetők, de nagy erőkkel dolgozunk ezek kémiai jellemzésén. Ezzel kapcsolatban érdemes megjegyezni azt, hogy bár a metHbperoxid reakcióban képződő Hb szabadgyök EPR-el való detektálása 1950-es évekre nyúlik vissza¹³⁸, a kémiai szerkezete és összetétele ennek a reakcióelegynek a mai napig nem tisztázott¹³⁵. Ahogyan azt a 4.3.1 fejezetben tárgyaltam, véleményünk szerint a szulfid biológiai antioxidáns hatásai egyéb tiolok nagy koncentrációját figyelembe véve, nem a ROS-ok közvetlen közömbösítésén keresztül valósul meg. A fent említett reakciók viszont magyarázatul szolgálhatnak az egyes esetekben mért antioxidáns hatásokra, mert a fémcentrumok a fehérjék aktív centrumaiban nehezen, vagy egyáltalán nem elérhetők peptid és fehérje tiolok számára (különösen igaz ez az MPO-ra) a szulfiddal ellentétben, amely kis méretének és a H₂S forma semleges töltésének köszönhetően könnyen hozzájuk fér. A reakciók mért sebességi állandói 1-3 nagyságrenddel nagyobbak mint az elsődleges oxidált hem-származék közömbösítőnek vélt aszkorbinsav és húgysav esetén^{136, 139}.

4.3.3 A szulfid- és NO-vezérelt jelátviteli útvonalak kommunkációja kémiai szemszögből Az 1998-as orvosi Nobel-díjat az NO, jelátviteli utak vezérlésében betöltött szerepének kutatásáért ítélték oda¹⁴⁰. A szulfid biológiáját kutató körökben egyre nagyobb figyelmet kap a szulfid és az NO vezérelte jelátviteli utak közötti kommunikáció. Például az érképzésben és az értágító hatásokban komolyan összejátszanak és a zavartalan érműködéshez mindkettőre alapvető szükség van¹⁴¹. A szulfid és a NO jelátviteli utak egymásra gyakorolt hatásainak a molekuláris mechanizmusai azonban nem tisztázottak. Prof. Martin Feelisch kutatócsoportjával együttműködve célul tűztük ki ezért, a két molekula kémiai kölcsönhatásainak kutatását biológiai vonatkozásban. A NO jelátvitelben kulcsszerepet játszó nitrozotiolok és a szulfid reakciójában, szulfid felesleg mellett többek közt egy 412 nm abszorbancia maximummal rendelkező sárga molekula képződik (103. ábra)^{C33}.



103. ábra A nitrozotiolok szulfiddal való reakciója egy sárga termék képződéséhez vezet. UV–látható spektrofotometriával rögzített spektrális változások a SNAP- szulfiddal való reakciójában pH = 7,4-nél. Változó SNAP/Na₂S koncentráció arányoknál 1min (A) és 10 min (B) inkubálás hatására különböző spektrális sajátságú termékek/ köztitermékek képződnek. Szulfid felesleg mellett egy sárga, 412 nm Abs maximummal rendelkező relatíve stabilis termék képződése volt megfigyelhető.^{C33}

Ez összhangban van Seel és Wagner és Munro és Williams erősen lúgos közegben végzett kísérleti eredményeivel akik azt a javaslatot tették, hogy a sárga termék nitrozoperszulfid (SSNO⁻)^{142, 143}. A sárga termék képződése akkor is megfigyelhető volt, ha szulfidot NO vizes oldatával vagy egyéb NO-donor molekulákkal kevertük össze (104.A-D. ábra).





104. ábra A NO szulfiddal való reakciója három fő termék képződését eredményezi: SSNO⁻ (λ max = 412 nm), HS_x⁻ (λ max = 290 – 300 nm), és SULFI/NO (λ max = 259 nm). (A) 200 µM NO Ar-nal telített foszfát pufferes (pH = 7,4) oldatának reakciója 2 mM szulfiddal SSNO⁻ (λ max = 412 nm) és HS_x⁻ λ max < 300 nm (HSN⁻) termékeket ad. A spektrumokat a keverés után rögtön (kék vonal) és ezután 5 s-onként vettük fel. (Betét) Az SSNO⁻ képződését követő tipikus kinetikai görbe 412 nm-nél. (B) Az NO donor DEA/NO (1 mM) szulfiddal (10 mM) való reakciója normál levegővel telített oldatokban szintén SSNO⁻ és HS_x⁻ képződését eredményezi. (Betét) Az SSNO⁻ képződését követő tipikus kinetikai görbe 412 nm-nél. (C és D) A képződő SSNO- koncentrációja függ a szulfid koncentrációtól (C) és a NO donorból való NO felszabadulás sebességétől (D); a spektrumokat keverés után 10 min elteltével vettük fel. (E) SSNO⁻ (λ max = 412 nm), HS_x⁻ $(\lambda max = 290-300 \text{ nm})$, és SULFI/NO $(\lambda max = 259 \text{ nm})$ képződik a nitrozotiol SNAP szulfiddal való reakciójában (1mM SNAP + 10 mM Na2S; 10 min); A SULFI/NO detektálható volt a szulfid nitrogénnel való buborékolás hatására tötrénő eltávolításával. (F) HS_x^- (12,5–200 μ M) hozzáadásával az SSNO⁻ képződés sebessége növelhető a SNAP (200 μM) szulfiddal (2 mM) való reakciójában; a kis HS_x⁻ koncentrációknál mért indukciós periódus autokatalitikus effektusra utal. Az az észlelés, hogy ez nagyobb $HS_x^$ koncentrációknál eltünik arra utal, hogy az autokatalízis a poliszulfidok képződésén keresztül valósul meg. A spektrumok 3-10 független kísérletet reprezentálnak.^{C34}

A mechanizmus részletes vizsgálata során feltételeztük, hogy a R-SNO-szulfid reakcióban képződnek poliszulfidok is melyekre jellemző az UV spektrumban 280 nm hullámhossznál mérhető elnyelés (104.E. ábra). A poliszulfidok mint termékek jelenlétét több oldalról alátámasztottuk: 1) A reakcióelegy DTT-vel való redukciója révén a 280 nm-nél detektálható elnyelés csökken (105.A. ábra). 2) Ezzel egyidőben a metilénkék és

monobromobimán módszerekkel^{C26} szulfid felszabadulás volt mérhető. 3) Savanyítás mellett vagy pH = 7-nél kénkiválást tapasztaltunk, amit kloroformos extrakció segítségével igazoltunk^{C28} (105.E. ábra). 4) Hideg cianolízis módszerrel kvantitatíven meghatároztuk a 0 oxidációs állapotú ként (szulfán-kén).

A sárga termék nem volt redukálható DTT-vel és cianiddal, de savanyítás hatására gyorsan elbomlott (105.A,B. ábra). Foszfát pufferben pH = 7-nél viszonylag stabilnak bizonyult, lassú bomlásával egyidőben több oldalról (cianolízis, DTT jelenlétében szulfid felszabadulás és kloroformos extrakció segítségével) poliszulfidok képződését igazoltuk (105.C-E. ábra). Kinetikai vizsgálataink igazolták, hogy a poliszulfidok nem csak bomlástermékei, hanem a képződés köztitermékei is voltak a sárga vegyületnek (104.F. ábra).



105. ábra Az SSNO⁻ nem reagál DTT-vel vagy cianiddal és bomlásakor szulfán-kén és szulfid szabadul fel. (A,B) 5mM DTT (pH = 7,4-nél) vagy 55 mM KCN (pH = 9,3-nál)

hozzáadása a SNAP (500 μ M)/szulfid (5 mM) elegyhez redukálja a poliszulfidokat, de a SSNO⁻ nem lép reakcióba (412 nm). (C) Az SSNO⁻ bomlási sebessége nem változik nagy pH-n vagy nagy mennyiségű DTT (500 μ M) vagy cianid (55 mM pH 9,3) jelenlétében (n = 3). +Ar a szulfid Ar-gáz buborékoltatásának hatására való szulfid eltávolítást jelez. (D) SSNO⁻ bomlása közben 5 mM DTT jelenlétében felszabaduló szulfid metilénkék módszerrel^{C26} mért koncentráció változása (n = 3). (E) SSNO⁻ bomlását kísérő szulfán-kén felszabadulásának mérése kloroformos extrakcióval^{C28}. Bal panel szemlélteti, hogy poliszulfidok nemcsak a SNAP – szulfid reakciónak a termékei, de a SSNO⁻ bomlása közben is képződnek. Középső panel: SSNO⁻ bomlásának következtében képződő poliszulfidokból kapott kloroformba extrahált elemi kén reprezentatív spektruma. Betét: elemi kén kloroformban való feloldásával készített belső standard reprezentatív spektruma. Jobb panel: A Bal panelnek megfelelő A és B reakciókban képződő poliszulfidok relatív koncentráció aránya (n = 3).^{C34}

Végül különböző tömegspektrometriás módszerekkel (pontos tömeg, ¹⁵N izotópos jelölés, fragmentációs spektrum analízis, reakcióelegy direkt infúziós tanulmányozása) igazoltuk, hogy a sárga termék valóban SSNO⁻. Kísérleteinkkel összhangban az SSNO⁻ képződésére az alábbi modellt javasoltuk:

$$RSNO + H_2S \rightarrow RSH + HSNO$$
(51)

$$HSNO + H_2S \rightarrow HSSH + HNO$$
(52)

$$HSSH + RSNO \rightarrow HSSNO + RSH$$
(50)

$$HSSH + HSNO \rightarrow HSSNO + H_2S$$
(51)

Igazoltuk, hogy a reakció termékei közt szerepel még az N-nitrozohidroxilamin N-szulfonát (SULFI/NO) is. Kísérleteink arra utaltak, hogy ennek a vegyületnek a legvalószínűbb képződési mechanizmusa a gyökös reakciókban vagy HONS/HSNO-n keresztül képződő tioszulfátból származó szulfit NO-dal való reakciója.

A javasolt sokrétű reakcióutak közül egy példa:

$$HNSO \rightleftharpoons HOSN \rightleftharpoons HSNO \rightleftharpoons HONS$$
(52)

$$HONS + 2 H_2O \rightarrow HONH_2 + S(OH)_2$$
(53)

$$2 S(OH)_2 \to S_2 O_3^{2-} + H_2 O + 2H^+$$
(54)

$$S_2 O_3^{2-} + H^+ \rightarrow HSO_3^- + S_8$$

$$(55)$$

$$HSO_3^- + 2NO^{\bullet} \to N(O)N(OH)SO_3^-$$
(56)

Kutatásaink tehát rávilágítottak arra, hogy a szulfid és NO kémiai kölcsönhatásaiban 3 fő termék képződik: SSNO⁻, SULFI/NO és poliszulfidok. Ezek fiziológiás tulajdonságait Prof Martin Feelisch és Prof Karol Ondrias kutatócsoportjaival együttműködve tanulmányoztuk. A kísérletes munkák nagy része az Ő laboratóriumaikban folyt, melyeknek eredményeképp többek közt megállapítottuk, hogy: 1) Az SSNO⁻ rezisztens a sejten belüli redukáló közegre, lassú bomlása NO felszabadulással jár, ami az endogén úton termelt NO elnyújtott biológiai hatásaiért (többek közt az oldható *guanilil cikláz* enzim aktiválása és ezen keresztül a vérnyomás szabályozása) lehet felelős. 2) A poliszulfidok mint a szulfid-NO kölcsönhatás illetve az SSNO⁻ bomlás termékei szintén vérnyomáscsökkentő hatásúak. 3) A SULFI/NO NO és HNO donorként viselkedik és moderáltan vérnyomáscsökkentő hatása mellett fokozza a szívizomzat teljesítményét (pozitív ionotróp hatású)^{C33,C34,C35}.

5 Kitekintés és a dolgozatban ismertetett eredmények jövőbeni hasznosításai.

A modern, célzott terápiás onkológiai kezelések alappilléréül szolgálnak azok az alapkutatások, amelyek az egészséges és tumorsejtek biológiájában jelentkező különbségek feltárására irányulnak. Ilyen alapvető eltérés jelentkezik például a tumorsejtek által endogén utakon termelt ROS mennyiségében és minőségében és az azokat közömbösítő antioxidáns fehérjék termelésében. Ezt kiaknázandó, az amerikai "National Cancer Institute" a közelmúltban kiemelt jelentőségű irányvonalnak kiáltotta ki az úgynevezett redoxiterápiás lehetőségek kutatását¹⁴⁴. A redoxterápiás kutatások többsége azon a felismerésen alapul, hogy a sejten belüli redoxiegyensúly megborítása a daganatos sejtekben hamarabb indukál apoptotikus sejthalált, mivel az oxidatív stresszre való adaptációs lehetőségek ezekben a sejtekben már javarészt ki vannak használva a karciogenezis alatt megnövekedett ROS termelés ellensúlyozására. Eredményeink a sejten belüli oxidatív stressz közömbösítésének és biológiai/biokémiai következményeinek molekuláris mechanizmusaiba ad betekintést az

ezekben a folyamatokban főszerepet játszó reakciók kinetikai paramétereinek meghatározásán és reakciómechanizmusainak vizsgálatain keresztül.

A sejtek redoxibiológiai tulajdonságai lényeges szerepet töltenek be a jelenlegi kizárólagos terápiás célpontok, a foszforilációs útvonalak, szabályozásában^{145, 146}. Az ilyen redoxireakciók által vezérelt jelátviteli folyamatokban a fehérjék cisztein (Cys) aminosav komponensei játszák a főszerepet. A foszforilációs jelátviteli útvonalak meghatározó komponensein túl egyéb létfontosságú fehérjék, például membrán csatornák, transzkripciós faktorok, metabolikus enzimek működését is szabályozzák közvetlen vagy közvetett módon a Cys aminosavaik redoxireakciói. A peptidek és fehérjék Cys aminosav komponenseinek ROS-okkal való reakcióinak kinetikai vizsgálatai és a reakciómechanizmusok értelmezése ezért kulcsszerepet játszhat a sejt biológiai vezérlésének mélyebb megértésében és a célzott terápiákra való rezisztenciamechanizmusok felderítésében.

A hidrogén-szulfid által vezérelt jelátviteli útvonalaknak a kinetikai vizsgálatai és a reakciók mechanizmusainak *in vitro* feltérképezése alapvető szerepet tölthet be ezen újonnan felfedezett kis jelátviteli molekula széleskörű fiziológiás hatásainak értelmezésében. Az általunk meghatározott kinetikai paraméterek többek közt betekintést adhatnak abba, hogy az adott reakciónak a biológiai környezetben való lejátszódása releváns vagy nem, a reakciónak az észlelt biológiai hatásokban lehet-e szerepe vagy sem. A biológiai hatások hátterében álló fontosabb reakciók mechanizmusainak feltérképezése az adott fiziológiás/patofiziológiás folyamat mélyebb megértését segíti, amivel új terápiás célpontok azonosításával új gyógyszerek kifejlesztésére adhat lehetőséget.

Saját kutatócsoportunk is nagy erőkkel dolgozik a dolgozatban ismertetett eredmények fiziológiai jelentőségének kutatásán, elsősorban daganatos betegségek vonatkozásában. A dolgozatban ismertetett eredményeink által szerzett ismereteink segítségével célunk, hogy tiol enzimek alapvető funkcióit vizsgáljuk onkológiai vonatkozásban. Ennek érdekében osztályunkon intenzíven tanulmányozzuk az új redoxiproteomikai módszerek kifejlesztésének lehetőségeit. Többek között a stockholmi Karolinska Intézet proteomikai centrumának vezetőjével, Janne Lehtiö-vel, együttműködve egy nagyon érzékeny módszer kidolgozását tűztük ki célul. Ígéretes előkísérletek igazolták, hogy újonnan kidolgozott protokollunk eddig nem tapasztalt érzékenységgel képes több ezer fehérje oxidatív poszttranszációs módosulatának a detektálására a teljes foszforilációs proteom mellett. Az eljárás tökéletesítésével meggyőződésünk, hogy a daganatos betegségek gyógyításában és a biomarker kutatásban fontos felfedezésekre nyílik majd lehetőségünk.

127

Vizsgáljuk többek között: 1) Az EGF hatására indukált redoxijelátviteli folyamatok^{145,C22} hatását EGFR-t célzó kezelések effektivitásaira.

Jelenleg a Sunitinib (EGFR gátló) hatására bekövetkező változásokat detektáljuk A431 humán laphámrák sejtek redoxiproteomjában. 2) A sejtek redoxi őrszemeinek, a peroxiredoxin fehérjecsaládnak, a szerepeit a daganatos betegség kialakulásában és a gyógyszeres/sugár terápiákra való rezisztenciában/érzékenyítésben. Új 2D gélelektroforézises elválasztáson és fluoreszcens jelölésen és tömegspektrometriás azonosításon alapuló saját redoxiproteomikai módszerünk segítségével már sikerült a Paklitaxel kemoterápiás gyógyszer által indukált oxidatív stressz első számú célpont fehérjéjének az azonosítása, amely a gyógyszer hatásmechanizmusának új dimenziójára vetít fényt.

Kutatásaink másik irányvonalát képviseli a hidrogén-szulfid onkológiai vonatkozású fiziológiás tulajdonságainak vizsgálatai. Tumorsejtekben, a CBS és CSE enzimek túltermelése révén, a szulfid meghatározó tumor növekedési faktorként és ezáltal terápiás célpontként léphet elő^{147, 148}.

Laboratóriumunkban egy új CBS enzim aktivitást mérő nagy érzékenységű módszert fejlesztettünk ki, amivel hipotézisünk szerint humán vérben tudjuk majd mérni a tumorból a keringésbe kikerülő enzim aktivitását és a módszer biomarker potenciálját több klinikai vonatkozásban (malignus elváltozás jelenléte, terápia hatékonysága, tumorprogresszió stb).

Humán tumor szövetmintákon vizsgáljuk továbbá a szulfidtermelő enzimek szerepét a daganatos betegség klinikai vonatkozásaiban. Előkísérleteink arra utalnak, hogy a CSE nagyon szignifikánsan túltermelt a tumor szövetben az egészséges kontrolhoz képest (106. ábra), ami arra utal, hogy nem kis sejtes tüdő tumorok kialakulásában és progressziójában fontos szerep juthat a hidrogén-szulfidnak.

128



106. ábra Nem kis sejtes tüdő karcinómában a tumor sejtek CSE expressziója szignifikánsan megnövekedett az egészséges kontrollhoz képest. 20 nem kis sejtes tüdő karcinómában szenvedő beteg operációjának következtében eltávolított tumor és egészséges szövet mintáiban mért CSE, CBS és 3MST (lásd 106. ábra) enzim expressziók relatív arányai. A *P** párosított t-teszttel végzett statisztikai kiértékelés szignifikanciáját jelzi. Az enzimek relatív mennyiségeit (egészséges vs a hozzá tartozó tumor szövet) a mélyfagyasztott minták porítását, lizálását követő WB analízis segítségével határoztuk meg. A felvitt relatív mennyiségeket egy HRP-vel konnyugált aktin antitesttel való WB analízis eredményének segítségével korrigáltuk. A korrigált mennyiségekkel is újra blottoltuk a mintákat aktinra és ahol szükséges volt korrekciós faktort használtunk a szulfid termelő enzimek expresszió analízisének precízebb vizsgálata érdekében.

6 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt nagyon hálás vagyok Kásler Miklós Professzor Úrnak azért, hogy hosszú külföldi tanulmányutam végén megteremtette a lehetőségét annak, hogy az Országos Onkológiai Intézetben létrehozzam saját kutatócsoportomat, a Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztályt (MITO). A külföldről való hazatelepedésünk nagy részben Neki is köszönhető. Köszönöm, hogy Professzor Úr azóta is messzemenően, töretlenül támogatja munkámat.

Saját kutatómunkám és független tudományos gondolkodásom elindítását Fábián István Professzor Úrnak köszönhetem, aki folyamatosan szemmel kíséri és segíti a kutatásaimat és a magyar tudomány világába való boldogulásomat/beilleszkedésemet. Fábián Professzor Urat külön köszönet illeti a dolgozat kritikus szakmai átnézéséért, segítő kommentárjaival emelte annak színvonalát.

A kutatói világba való bevezetésem és az oldatkémiai szemléletem kialakulása PhD témavezetőmnek, Prof. Tóth Imrének köszönhető, aki a habilitálásomban is messzemenően támogatott.

A biológiailag fontos reakciók világának megismerését Prof. Michael T. Ashby-nek köszönhetem, akivel 3 évet dolgoztam együtt az Oklahomai egyetemen.

A biokémia és biológia világába Christine Winterbourn Professzor Asszony vezetett be, továbbá a kézirat és pályázatírás útvesztőjében az Ő támogatásával kezdtem el boldogulni.

Hálás vagyok a MITO minden tagjának, Ballagó Krisztinának, Bíró Adriennek, Bogdándi Virágnak, Budai Barnának, Dóka Évának, Garai Dorottyának, Lénárt Zsuzsannának, Nagy Attilának, Pálinkás Zoltánnak és Vasas, Anitának; nélkülük ez a munka nem jöhetett volna létre. A jelenlegi kutatási területeinknek a kialakításában és az Osztály tudományos műhellyé kovácsolásában elengedhetetlen szerepük volt/van. Köszönettel tartozom az Osztály dolgozóinaknak a kutatómunkához nagyon fontos jó hangulat megteremtéséért is. Külön köszönet jár Lénárt Zsuzsannának és Dóka Évának, akik a dolgozat formázásában, az ábrák elkészítésében és a referenciák illetve a tudománymetriai adatok összeállításában nélkülözhetetlen segítségemre voltak.

Köszönet illeti minden külföldi és hazai kollaborátoromat, társszerzőmet illet minden önkéntes véradót, akik természetesen a felfedezések kulcsszereplői.

Nagyon hálás vagyok Király Róbert Docens Úrnak, a dolgozat rendkívül alapos átnézéséért, lektorálásáért és nagyon hasznos tanácsaiért.

Töretlen szeretetükért, bizalmukért és támogatásukért nagyon hálás vagyok Édesanyámnak és Édesapámnak. Ők örök támaszaim és megerősítőim a megpróbáltatásokban.

Köszönöm feleségemnek, és a családomnak a munka alatt nyújtott, az élet minden területét átfogó, támogatását és töretlen szeretetét. A dolgozatot két kislányomnak Lilly-Annénak és Emily Hannának ajánlom. Ők a világosság az alagút végén, a mosoly és boldogság megtestesítői. Ha szorgalmasan dolgoztok kicsi manók, akkor egyszer Nektek is lehet ehhez hasonló, vagy ennél sokkal jobb pályaművetek.

7 Irodalomjegyzék

- 1. V. Darley-Usmar, T. Grune, S. Lamas, T. Y. Aw, Redox Biology celebrates its first anniversary with over 100 articles, Listing In PubMed and 120,000 downloads with over 230 citations! Redox Biology 2, 640-641 (2014).
- 2. B. Halliwell, J. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. (OUP Oxford, 2007).
- 3. J. M. Herrmann, T. P. Dick, Redox Biology on the rise. Biological Chemistry 393, 999-1004 (2012).
- 4. C. C. Winterbourn, Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Nature Chemical Biology 4, 278-286 (2008).
- 5. M. P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochemical Journal 417, 1-13 (2009).
- 6. M. B. Hampton, A. J. Kettle, C. C. Winterbourn, Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood 92, 3007-3017 (1998).
- S. J. Klebanoff, A. J. Kettle, H. Rosen, C. C. Winterbourn, W. M. Nauseef, Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. Journal of Leukocyte Biology 93, 185-198 (2013).
- 8. A. W. Segal, How neutrophils kill microbes. Annual Review of Immunology 23, 197-223 (2005).
- 9. C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. Antioxidants & Redox Signaling 18, 642-660 (2013).
- 10. B. Halliwell, Free radicals and antioxidants: updating a personal view. Nutrition Reviews 70, 257-265 (2012).
- 11. L. Li, P. Rose, P. K. Moore, Hydrogen sulfide and cell signaling. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 51, 169-187 (2011).
- 12. K. Abe, H. Kimura, The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. Journal of Neuroscience 16, 1066-1071 (1996).
- 13. C. Szabo, Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. Nature Reviews Drug Discovery 6, 917-935 (2007).
- 14. B. D. Paul, S. H. Snyder, H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. Nature Reviews Molecular Cell Biology 13, 499-507 (2012).
- 15. J. L. Wallace, R. Wang, Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. Nature Reviews Drug Discovery 14, 329-345 (2015).
- 16. R. Wang, Physiological implications of hydrogen sulfide: A whiff exploration that blossomed. Physiological Reviews 92, 791-896 (2012).
- 17. R. Wang, Toxic gas, lifesaver. Scientific American 302, 66-71 (2010).
- T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai, M. Suematsu, H. Motohashi, S. Fujii, T. Matsunaga, M. Yamamoto, K. Ono, N. O. Devarie-Baez, M. Xian, J. M. Fukuto, T. Akaike, Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111, 7606-7611 (2014).
- A. K. Mustafa, M. M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. Mu, S. K. Gazi, R. K. Barrow, G. Yang, R. Wang, S. H. Snyder, H₂S signals through protein S-sulfhydration. Science Signaling 2, ra72 (2009).

- 20. K. Bedard, K. H. Krause, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. Physiological Reviews 87, 245-313 (2007).
- 21. Y. Li, T. T. Huang, E. J. Carlson, S. Melov, P. C. Ursell, J. L. Olson, L. J. Noble, M. P. Yoshimura, C. Berger, P. H. Chan, D. C. Wallace, C. J. Epstein, Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. Nature Genetics 11, 376-381 (1995).
- 22. W. M. Nauseef, Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. The Journal of Biological Chemistry 283, 16961-16965 (2008).
- 23. B. Halliwell, Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochemical Journal 401, 1-11 (2007).
- 24. M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions 160, 1-40 (2006).
- 25. J. P. Fruehauf, F. L. Meyskens, Jr., Reactive oxygen species: a breath of life or death? Clinical Cancer Research 13, 789-794 (2007).
- 26. C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. Biochemical and Biophysical Research Communications 305, 729-736 (2003).
- 27. J. M. McCord, I. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). The Journal of Biological Chemistry 244, 6049-6055 (1969).
- 28. P. R. Gardner, I. Fridovich, Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. The Journal of Biological Chemistry 266, 19328-19333 (1991).
- 29. J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman, Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite Implications for endothelial injury from nitric-oxide and superoxide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 1620-1624 (1990).
- 30. T. Nauser, W. H. Koppenol, The rate constant of the reaction of superoxide with nitrogen monoxide: Approaching the diffusion limit. Journal of Physical Chemistry A 106, 4084-4086 (2002).
- N. d'Alessandro, G. Bianchi, X. W. Fang, F. M. Jin, H. P. Schuchmann, C. von Sonntag, Reaction of superoxide with phenoxyl-type radicals. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2, 1862-1867 (2000).
- 32. M. Jonsson, J. Lind, T. Reitberger, T. E. Eriksen, G. Merenyi, Free radical combination reactions involving phenoxyl radicals. Journal of Physical Chemistry 97, 8229-8233 (1993).
- 33. M. F. Beal, Oxidatively modified proteins in aging and disease. Free Radical Biology and Medicine 32, 797-803 (2002).
- T. DiMarco, C. Giulivi, Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples. Mass Spectrometry Reviews 26, 108-120 (2007).
- 35. J. W. Heinecke, W. Li, H. L. Daehnke, 3rd, J. A. Goldstein, Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. The Journal of Biological Chemistry 268, 4069-4077 (1993).
- 36. J. W. Heinecke, W. Li, G. A. Francis, J. A. Goldstein, Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. Journal of Clinical Investigation 91, 2866-2872 (1993).
- 37. C. Gay, J. Collins, J. M. Gebicki, Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. Analytical Biochemistry 273, 149-155 (1999).

- S. P. Wolff, Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt C 233, 182-189 (1994).
- C. C. Winterbourn, H. N. Parsons-Mair, S. Gebicki, J. M. Gebicki, M. J. Davies, Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides. Biochemical Journal 381, 241-248 (2004).
- 40. H. Pichorner, D. Metodiewa, C. C. Winterbourn, Generation of superoxide and tyrosine peroxide as a result of tyrosyl radical scavenging by glutathione. Archives of Biochemistry and Biophysics 323, 429-437 (1995).
- N. Ito, S. E. Phillips, C. Stevens, Z. B. Ogel, M. J. McPherson, J. N. Keen, K. D. Yadav, P. F. Knowles, Novel thioether bond revealed by a 1.7 A crystal structure of galactose oxidase. Nature 350, 87-90 (1991).
- 42. E. Siakkou, M. T. Rutledge, S. M. Wilbanks, G. N. L. Jameson, Correlating crosslink formation with enzymatic activity in cysteine dioxygenase. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 1814, 2003-2009 (2011).
- 43. C. R. Simmons, Q. Liu, Q. Huang, Q. Hao, T. P. Begley, P. A. Karplus, M. H. Stipanuk, Crystal structure of mammalian cysteine dioxygenase. A novel mononuclear iron center for cysteine thiol oxidation. The Journal of Biological Chemistry 281, 18723-18733 (2006).
- 44. D. C. Liebler, Protein damage by reactive electrophiles: targets and consequences. Chemical Research in Toxicology 21, 117-128 (2008).
- 45. T. K. Rudolph, B. A. Freeman, Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. Science Signaling 2, re7 (2009).
- 46. L. M. Sayre, D. Lin, Q. Yuan, X. Zhu, X. Tang, Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. Drug Metabolism Reviews 38, 651-675 (2006).
- 47. C. Stein, A. H. S. Hassan, K. Lehrberger, J. Giefing, A. Yassouridis, Local analgesic effect of endogenous opioid-peptides. Lancet 342, 321-324 (1993).
- C. Stein, A. H. S. Hassan, R. Przewlocki, C. Gramsch, K. Peter, A. Herz, Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 5935-5939 (1990).
- 49. D. Labuz, Y. Schmidt, A. Schreiter, H. L. Rittner, S. A. Mousa, H. Machelska, Immune cellderived opioids protect against neuropathic pain in mice. Journal of Clinical Investigation 119, 278-286 (2009).
- H. L. Rittner, D. Hackel, P. Voigt, S. Mousa, A. Stolz, D. Labuz, M. Schafer, M. Schaefer, C. Stein, A. Brack, Mycobacteria attenuate nociceptive responses by formyl peptide receptor triggered opioid peptide release from neutrophils. PLoS Pathogens 5, (2009).
- 51. H. L. Rittner, D. Hackel, R. S. Yamdeu, S. A. Mousa, C. Stein, M. Schafer, A. Brack, Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue-Role of hypertonicity and the perineurium. Brain Behavior and Immunity 23, 548-557 (2009).
- 52. H. L. Rittner, D. Labuz, J. F. Richter, A. Brack, M. Schafer, C. Stein, S. A. Mousa, CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules in vitro and in vivo. Brain Behavior and Immunity 21, 1021-1032 (2007).
- 53. K. S. Hui, Brain-specific aminopeptidase: From enkephalinase to protector against neurodegeneration. Neurochemical Research 32, 2062-2071 (2007).
- 54. H. Lentzen, J. Palenker, Localization of the thiorphan-sensitive endopeptidase, termed enkephalinase-A, on glial-cells. FEBS Letters 153, 93-97 (1983).

- 55. J. C. Schwartz, J. Costentin, J. M. Lecomte, Pharmacology of enkephalinase inhibitors. Trends in Pharmacological Sciences 6, 472-476 (1985).
- 56. C. Nussbaum, A. Klinke, M. Adam, S. Baldus, M. Sperandio, Myeloperoxidase: a leukocytederived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. Antioxidants & Redox Signaling 18, 692-713 (2013).
- M. J. Davies, C. L. Hawkins, D. I. Pattison, M. D. Rees, Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. Antioxidants & Redox Signaling 10, 1199-1234 (2008).
- 58. H. B. Dunford, *Heme peroxidases*. (John Wiley, 1999).
- 59. L. Gonzalez, M. Barlow, S. Deo, D. Yoshishige, H. Jones, J. L. Caffrey, Proenkephalin derived peptides in canine neutrophils. FASEB Journal 21, A1394-A1394 (2007).
- 60. A. Menzebach, J. Hirsch, G. Hempelmann, I. D. Welters, Effects of endogenous and synthetic opioid peptides on neutrophil function in vitro. British Journal of Anaesthesia 91, 546-550 (2003).
- 61. J. Pasnik, H. Tchorzewski, Z. Baj, M. Luciak, M. Tchorzewski, Priming effect of metenkephalin and beta-endorphin on chemiluminescence, chemotaxis and CD11b molecule expression on human neutrophils in vitro. Immunology Letters 67, 77-83 (1999).
- 62. P. W. Schiller, C. F. Yam, M. Lis, Evidence for topographical analogy between methionineenkephalin and morphine derivatives. Biochemistry 16, 1831-1838 (1977).
- J. A. DeGray, M. R. Gunther, R. TschirretGuth, P. R. O. deMontellano, R. P. Mason, Peroxidation of a specific tryptophan of metmyoglobin by hydrogen peroxide. Journal of Biological Chemistry 272, 2359-2362 (1997).
- 64. M. R. Gunther, B. E. Sturgeon, R. P. Mason, A long-lived tyrosyl radical from the reaction between horse metmyoglobin and hydrogen peroxide. Free Radical Biology and Medicine 28, 709-719 (2000).
- C. D. Detweiler, O. M. Lardinois, L. J. Deterding, P. R. de Montellano, K. B. Tomer, R. P. Mason, Identification of the myoglobin tyrosyl radical by immuno-spin trapping and its dimerization. Free Radic Biol Med 38, 969-976 (2005).
- 66. M. J. Davies, The oxidative environment and protein damage. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 1703, 93-109 (2005).
- 67. P. E. Morgan, R. T. Dean, M. J. Davies, Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen attack. European Journal of Biochemistry 269, 1916-1925 (2002).
- 68. P. E. Morgan, R. T. Dean, M. J. Davies, Protective mechanisms against peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen. Free Radical Biology and Medicine 36, 484-496 (2004).
- 69. B. H. Shao, M. N. Oda, J. F. Oram, J. W. Heinecke, Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein. Chemical Research in Toxicology 23, 447-454 (2010).
- 70. D. P. Jones, Radical-free biology of oxidative stress. American Journal of Physiology Cell Physiology 295, C849-868 (2008).
- 71. M. Kemp, Y. M. Go, D. P. Jones, Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. Free Radical Biology and Medicine 44, 921-937 (2008).
- 72. N. Brandes, S. Schmitt, U. Jakob, Thiol-Based Redox Switches in Eukaryotic Proteins. Antioxidants & Redox Signaling 11, 997-1014 (2009).

- 73. D. I. Pattison, M. J. Davies, Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. Current Medicinal Chemistry 13, 3271-3290 (2006).
- 74. J. Arnhold, E. Monzani, P. G. Furtmuller, M. Zederbauer, L. Casella, C. Obinger, Kinetics and thermodynamics of halide and nitrite oxidation by mammalian heme peroxidases. European Journal of Inorganic Chemistry, 3801-3811 (2006).
- 75. B. I. Fedeles, B. D. Freudenthal, E. Yau, V. Singh, S. C. Chang, D. Li, J. C. Delaney, S. H. Wilson, J. M. Essigmann, Intrinsic mutagenic properties of 5-chlorocytosine: A mechanistic connection between chronic inflammation and cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112, E4571-4580 (2015).
- 76. M. T. Ashby, A. C. Carlson, M. J. Scott, Redox buffering of hypochlorous acid by thiocyanate in physiologic fluids. Journal of the American Chemical Society 126, 15976-15977 (2004).
- 77. E. L. Thomas, Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate: equilibria between oxidized forms of thiocyanate. Biochemistry 20, 3273-3280 (1981).
- 78. E. L. Thomas, T. M. Aune, Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action. Infection and Immunity 20, 456-463 (1978).
- 79. J. A. Chesney, J. W. Eaton, J. R. Mahoney, Jr., Bacterial glutathione: a sacrificial defense against chlorine compounds. Journal of Bacteriology 178, 2131-2135 (1996).
- D. Luo, S. W. Smith, B. D. Anderson, Kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. Journal of Pharmaceutical Sciences 94, 304-316 (2005).
- A. V. Peskin, F. M. Low, L. N. Paton, G. J. Maghzal, M. B. Hampton, C. C. Winterbourn, The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. The Journal of Biological Chemistry 282, 11885-11892 (2007).
- 82. A. Hall, P. A. Karplus, L. B. Poole, Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. FEBS Journal 276, 2469-2477 (2009).
- 83. J. C. Toledo, Jr., R. Audi, R. Ogusucu, G. Monteiro, L. E. Netto, O. Augusto, Horseradish peroxidase compound I as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: from quantification to kinetics. Free Radical Biology and Medicine 50, 1032-1038 (2011).
- 84. A. G. Cox, A. V. Peskin, L. N. Paton, C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3. Biochemistry 48, 6495-6501 (2009).
- 85. A. Hall, K. Nelson, L. B. Poole, P. A. Karplus, Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. Antioxidants & Redox Signaling 15, 795-815 (2011).
- A. Hall, D. Parsonage, L. B. Poole, P. A. Karplus, Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. Journal of Molecular Biology 402, 194-209 (2010).
- 87. C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, Thiol chemistry and specificity in redox signaling. Free Radical Biology and Medicine 45, 549-561 (2008).
- 88. S. Gebicki, J. M. Gebicki, Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. Biochemical Journal 289 (Pt 3), 743-749 (1993).
- 89. S. Gieseg, S. Duggan, J. M. Gebicki, Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxyl radicals. Biochemical Journal 350, 215-218 (2000).
- J. A. Simpson, S. Narita, S. Gieseg, S. Gebicki, J. M. Gebicki, R. T. Dean, Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. Biochemical Journal 282 (Pt 3), 621-624 (1992).

- 91. D. A. Bates, C. C. Winterbourn, Reactions of Adriamycin with haemoglobin. Superoxide dismutase indirectly inhibits reactions of the Adriamycin semiquinone. Biochemical Journal 203, 155-160 (1982).
- 92. I. A. Cotgreave, P. Moldeus, Methodologies for the application of monobromobimane to the simultaneous analysis of soluble and protein thiol components of biological-systems. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 13, 231-249 (1986).
- F. M. Low, M. B. Hampton, A. V. Peskin, C. C. Winterbourn, Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. Blood 109, 2611-2617 (2007).
- 94. J. Nordberg, L. Zhong, A. Holmgren, E. S. Arner, Mammalian thioredoxin reductase is irreversibly inhibited by dinitrohalobenzenes by alkylation of both the redox active selenocysteine and its neighboring cysteine residue. The Journal of Biological Chemistry 273, 10835-10842 (1998).
- 95. C. C. Winterbourn, Oxidative reactions of hemoglobin. Methods in Enzymology 186, 265-272 (1990).
- 96. D. C. Doll, Oxidative haemolysis after administration of doxorubicin. British Medical Journal (Clinical Research Ed) 287, 180-181 (1983).
- 97. V. Gupta, K. S. Carroll, Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. Biochimica et Biophysica Acta 1840, 847-875 (2014).
- 98. J. R. Stone, An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. Archives of Biochemistry and Biophysics 422, 119-124 (2004).
- 99. J. W. Baty, M. B. Hampton, C. C. Winterbourn, Proteomic detection of hydrogen peroxidesensitive thiol proteins in Jurkat cells. Biochemical Journal 389, 785-795 (2005).
- 100. M. B. Hampton, S. Orrenius, Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. FEBS Letters 414, 552-556 (1997).
- 101. Y. Shi, F. Nikulenkov, J. Zawacka-Pankau, H. Li, R. Gabdoulline, J. Xu, S. Eriksson, E. Hedstrom, N. Issaeva, A. Kel, E. S. Arner, G. Selivanova, ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis. Cell Death & Differentiation 21, 612-623 (2014).
- 102. A. Weilbacher, M. Gutekunst, M. Oren, W. E. Aulitzky, H. van der Kuip, RITA can induce cell death in p53-defective cells independently of p53 function via activation of JNK/SAPK and p38. Cell Death & Disease 5, e1318 (2014).
- 103. N. Issaeva, P. Bozko, M. Enge, M. Protopopova, L. G. G. C. Verhoef, M. Masucci, A. Pramanik, G. Selivanova, Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. Nature Medicine 10, 1321-1328 (2004).
- 104. E. Hedstrom, S. Eriksson, J. Zawacka-Pankau, E. S. Arner, G. Selivanova, p53-dependent inhibition of TrxR1 contributes to the tumor-specific induction of apoptosis by RITA. Cell Cycle 8, 3584-3591 (2009).
- M. Wrona, K. Humphries, G. Dryhurst, in *Redox Chemistry and Interfacial Behavior of Biological Molecules*, G. Dryhurst, K. Niki, Eds. (Springer US, 1988), chap. 32, pp. 425-445.
- 106. B. Barquera, J. E. Morgan, D. Lukoyanov, C. P. Scholes, R. B. Gennis, M. J. Nilges, X- and W-band EPR and Q-band ENDOR studies of the flavin radical in the Na⁺ -translocating NADH:quinone oxidoreductase from Vibrio cholerae. Journal of the American Chemical Society 125, 265-275 (2003).
- 107. K. Fritz-Wolf, S. Kehr, M. Stumpf, S. Rahlfs, K. Becker, Crystal structure of the human thioredoxin reductase-thioredoxin complex. Nature Communications 2, 383 (2011).

- 108. G. K. Kolluru, S. Yuan, X. Shen, C. G. Kevil, H₂S regulation of nitric oxide metabolism. Methods in Enzymology 554, 271-297 (2015).
- O. Kabil, R. Banerjee, Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling. Antioxidants & Redox Signaling 20, 770-782 (2014).
- C. Szabo, C. Ransy, K. Modis, M. Andriamihaja, B. Murghes, C. Coletta, G. Olah, K. Yanagi, F. Bouillaud, Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. British Journal of Pharmacology 171, 2099-2122 (2014).
- 111. H. Kimura, Signaling molecules: hydrogen sulfide and polysulfide. Antioxidants & Redox Signaling 22, 362-376 (2015).
- 112. Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J. Oka, H. Kimura, Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain. FASEB Journal 27, 2451-2457 (2013).
- 113. A. L. Chapman, M. B. Hampton, R. Senthilmohan, C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, Chlorination of bacterial and neutrophil proteins during phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus. The Journal of Biological Chemistry 277, 9757-9762 (2002).
- 114. J. N. Green, A. J. Kettle, C. C. Winterbourn, Protein chlorination in neutrophil phagosomes and correlation with bacterial killing. Free Radical Biology and Medicine 77, 49-56 (2014).
- 115. T. V. Mishanina, M. Libiad, R. Banerjee, Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. Nature Chemical Biology 11, 457-464 (2015).
- 116. I. Pader, R. Sengupta, M. Cebula, J. Xu, J. O. Lundberg, A. Holmgren, K. Johansson, E. S. Arner, Thioredoxin-related protein of 14 kDa is an efficient L-cystine reductase and S-denitrosylase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111, 6964-6969 (2014).
- 117. V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature Protocols 1, 1112-1116 (2006).
- 118. R. Pietri, E. Roman-Morales, J. Lopez-Garriga, Hydrogen sulfide and hemeproteins: knowledge and mysteries. Antioxidants & Redox Signaling 15, 393-404 (2011).
- 119. S. C. Bir, C. G. Kevil, Sulfane sustains vascular health: insights into cystathionine gammalyase function. Circulation 127, 2472-2474 (2013).
- S. Mani, H. Li, A. Untereiner, L. Wu, G. Yang, R. C. Austin, J. G. Dickhout, S. Lhotak, Q. H. Meng, R. Wang, Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. Circulation 127, 2523-2534 (2013).
- 121. J. W. Elrod, J. W. Calvert, J. Morrison, J. E. Doeller, D. W. Kraus, L. Tao, X. Y. Jiao, R. Scalia, L. Kiss, C. Szabo, H. Kimura, C. W. Chow, D. J. Lefer, Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 15560-15565 (2007).
- 122. R. C. O. Zanardo, V. Brancaleone, E. Distrutti, S. Fiorucci, G. Cirino, J. L. Wallace, Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. FASEB Journal 20, 2118-2120 (2006).
- 123. M. Whiteman, R. Haigh, J. M. Tarr, K. M. Gooding, A. C. Shore, P. G. Winyard, Detection of hydrogen sulfide in plasma and knee-joint synovial fluid from rheumatoid arthritis patients: relation to clinical and laboratory measures of inflammation. Annals of the New York Academy of Sciences 1203, 146-150 (2010).
- 124. Q. H. Gong, X. R. Shi, Z. Y. Hong, L. L. Pan, X. H. Liu, Y. Z. Zhu, A new hope for neurodegeneration: possible role of hydrogen sulfide. Journal of Alzheimer's Disease 24 Suppl 2, 173-182 (2011).

- M. W. Johansson, M. Patarroyo, F. Oberg, A. Siegbahn, K. Nilsson, Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). Journal of Cell Science 110 (Pt 9), 1133-1139 (1997).
- 126. S. J. Nicholls, S. L. Hazen, Myeloperoxidase and cardiovascular disease. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 25, 1102-1111 (2005).
- 127. L. K. Stamp, I. Khalilova, J. M. Tarr, R. Senthilmohan, R. Turner, R. C. Haigh, P. G. Winyard, A. J. Kettle, Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 51, 1796-1803 (2012).
- 128. J. G. Wang, S. A. Mahmud, J. Nguyen, A. Slungaard, Thiocyanate-dependent induction of endothelial cell adhesion molecule expression by phagocyte peroxidases: a novel HOSCNspecific oxidant mechanism to amplify inflammation. Journal of Immunology 177, 8714-8722 (2006).
- 129. Y. W. Yap, M. Whiteman, N. S. Cheung, Chlorinative stress: An under appreciated mediator of neurodegeneration? Cellular Signalling 19, 219-228 (2007).
- 130. J. M. Dypbukt, C. Bishop, W. M. Brooks, B. Thong, H. Eriksson, A. J. Kettle, A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. Free Radical Biology and Medicine 39, 1468-1477 (2005).
- 131. P. P. Bradley, D. A. Priebat, R. D. Christensen, G. Rothstein, Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. Journal of Investigative Dermatology 78, 206-209 (1982).
- 132. J. Balla, H. S. Jacob, G. Balla, K. Nath, J. W. Eaton, G. M. Vercellotti, Endothelial-cell heme uptake from heme-proteins - induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 9285-9289 (1993).
- 133. L. Potor, E. Banyai, G. Becs, M. P. Soares, G. Balla, J. Balla, V. Jeney, Atherogenesis may involve the prooxidant and proinflammatory effects of ferryl hemoglobin. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, (2013).
- G. Silva, V. Jeney, A. Chora, R. Larsen, J. Balla, M. P. Soares, Oxidized hemoglobin is an endogenous proinflammatory agonist that targets vascular endothelial cells. The Journal of Biological Chemistry 284, 29582-29595 (2009).
- 135. C. E. Cooper, D. J. Schaer, P. W. Buehler, M. T. Wilson, B. J. Reeder, G. Silkstone, D. A. Svistunenko, L. Bulow, A. I. Alayash, Haptoglobin Binding Stabilizes Hemoglobin Ferryl Iron and the Globin Radical on Tyrosine beta 145. Antioxidants & Redox Signaling 18, 2264-2273 (2013).
- B. J. Reeder, M. Grey, R. L. Silaghi-Dumitrescu, D. A. Svistunenko, L. Bulow, C. E. Cooper, M. T. Wilson, Tyrosine residues as redox cofactors in human hemoglobin: implications for engineering nontoxic blood substitutes. The Journal of Biological Chemistry 283, 30780-30787 (2008).
- 137. H. O. Michel, A study of sulfhemoglobin. Journal of Biological Chemistry 126, 323-348 (1938).
- 138. J. F. Gibson, D. J. E. Ingram, Location of free electrons in porphin ring complexes. Nature 178, 871-872 (1956).
- C. E. Cooper, R. Silaghi-Dumitrescu, M. Rukengwa, A. I. Alayash, P. W. Buehler, Peroxidase activity of hemoglobin towards ascorbate and urate: a synergistic protective strategy against toxicity of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers (HBOC). Biochimica et Biophysica Acta 1784, 1415-1420 (2008).
- 140. R. SoRelle, Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries. Circulation 98, 2365-2366 (1998).

- 141. C. Coletta, A. Papapetropoulos, K. Erdelyi, G. Olah, K. Modis, P. Panopoulos, A. Asimakopoulou, D. Gero, I. Sharina, E. Martin, C. Szabo, Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, 9161-9166 (2012).
- 142. A. P. Munro, D. L. H. Williams, Reactivity of sulfur nucleophiles towards S-nitrosothiols. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2, 1794-1797 (2000).
- 143. F. Seel, M. Wagner, Reaction of sulfides with nitrogen monoxide in aqueous-solution. Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie 558, 189-192 (1988).
- 144. D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? Nature Reviews Drug Discovery 8, 579-591 (2009).
- 145. C. E. Paulsen, T. H. Truong, F. J. Garcia, A. Homann, V. Gupta, S. E. Leonard, K. S. Carroll, Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity. Nature Chemical Biology 8, 57-64 (2012).
- 146. M. C. Sobotta, W. Liou, S. Stocker, D. Talwar, M. Oehler, T. Ruppert, A. N. Scharf, T. P. Dick, Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. Nature Chemical Biology 11, 64-70 (2015).
- M. R. Hellmich, C. Coletta, C. Chao, C. Szabo, The therapeutic potential of cystathionine beta-synthetase/hydrogen sulfide inhibition in cancer. Antioxidants & Redox Signaling 22, 424-448 (2015).
- 148. C. Szabo, C. Coletta, C. Chao, K. Modis, B. Szczesny, A. Papapetropoulos, M. R. Hellmich, Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-beta-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 12474-12479 (2013).

8 Publikációk

8.1 A dolgozatban említett könyvfejezetek

A *-al jelzett könyvfejezetben levelező szerző vagyok.

- B1. Péter Nagy; Julie D. Becker; Rachael C. Mallo and Michael T. Ashby *The Jekyll and Hyde Roles of Cyesteine Derivatives During Oxidative Stress* New Biocides Development: The Combined Approach of Chemistry and Microbiology, Zhu, P., Ed. ACS Press: Washington, D.C., (2007), pp. 193-212
- B2. Péter Nagy* and Christine C. Winterbourn *Redox chemistry of biological thiols* Advances in Molecular Toxicology, Fishbein, J.C., Ed. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, (2010), Vol. 4, pp. 183-222 Invited review.
- B3. Péter Nagy* Mechanistic Chemical Perspective of Hydrogen Sulfide Signaling Methods in Enzymology, Hydrogen Sulfide in Redox Biology Part A & B (2015) 554, 3-29. Invited chapter.

8.2 A dolgozatban összefoglalt tudományos közlemények

A "*"-al jelzett cikkekben levelező szerző vagyok.

- C1. Katsuhiko Ono, Takaake Akaike, Tomohiro Sawa, Yoshito Kumagai, David A Wink, Dean J Tantillo, Adrian J Hobbs, Péter Nagy, Ming Xian, Joseph Lin, Jon M Fukuto *The Redox Chemistry and Chemical Biology of H₂S, Hydropersulfides and Derived Species: Implications to Their Possible Biological Activity and Utility* Free Radical Biology and Medicine (2014) 77, 82-94.
- C2. Péter Nagy, Anthony J. Kettle and Christine C. Winterbourn Superoxide-Mediated Formation of Tyrosine Hydroperoxides and Methionine Sulfoxide in Peptides through Radical Addition and Intramolecular Oxygen Transfer Journal of Biological Chemistry (2009) 284, 14723-33.
- C3. Péter Nagy, Thomas P. Lechte, Andrew B. Das and Christine C. Winterbourn Conjugation of Glutathione to Oxidized Tyrosine Residues in Peptides and Proteins Journal of Biological Chemistry (2012) 287, 26068-76.
- C4. Péter Nagy^{*}, Anthony J. Kettle and Christine C. Winterbourn Neutrophil-Mediated Oxidation of Enkephalins via Myeloperoxidase-Dependent Addition of Superoxide
 Free Radical Biology and Medicine (2010) 49, 792-99.
- C5. Andrew B. Das, Péter Nagy, Helen Abbott, Christine C. Winterbourn and Anthony J. Kettle *Reactions of Superoxide With the Myoglobin Tyrosyl Radical* **Free Radical Biology and Medicine** (2010) 48, 1540-47.
- C6. Andrew Das, Thomas Nauser, Willem H. Koppenol, Anthony J Kettle, Christine C. Winterbourn and Peter Nagy*
 Rapid reaction of superoxide with insulin-tyrosyl radicals to generate a hydroperoxide with subsequent glutathione addition Free Radical Biology and Medicine (2014) 70, 86-95.

- C7. Péter Nagy and Michael T. Ashby *Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanism of the Hydrolysis of Cysteine Thiosulfinate Ester* Chemical Research in Toxicology (2007) 20, 1364-72.
- C8. Péter Nagy and Michael T. Ashby Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanisms of the Oxidation of Cysteine by Hypohalous Acid to Give Cysteine Sulfenic Acid Journal of the American Chemical Society (2007) 129, 14082-91.
- C9. Péter Nagy, Kelemu Lemma, and Michael T. Ashby Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanisms of the Reaction of Cysteine Thiosulfinate Ester with Cysteine to Give Cysteine Sulfenic Acid Journal of Organic Chemistry (2007) 72, 8838-46.
- C10. Péter Nagy*

Kinetics and Mechanisms of Thiol-Disulfide Exchange Covering Direct Substitution and Thiol Oxidation-Mediated Pathways

Antioxidants and Redox Signaling Thiol-Disulfide Exchange Forum Issue (2012) Invited review (2013) 18(13), 1623-41.

- C11. Péter Nagy; Jennifer L. Beal and Michael T. Ashby *Thiocyanate is an Efficient Endogenous Scavenger for the Phagocytic Killing Agent Hypobromous Acid* **Chemical Research in Toxicology** (2006) 19, 587-93.
- C12. Péter Nagy; Susan S. Alguindigue and Michael T. Ashby Lactoperoxidase-Catalyzed Oxidation of Thiocyanate by Hydrogen Peroxide: A Reinvestigation of Hypothiocyanite by Nuclear Magnetic Resonance and Optical Spectroscopy Biochemistry (2006) 45, 12610-16.

C13. Péter Nagy, Kelemu Lemma, and Michael T. Ashby Kinetics and Mechanism of the Comproportionation of Hypothiocyanous Acid and

- *Kinetics and Mechanism of the Comproportionation of Hypothiocyanous Acid and Thiocyanate to Give Thiocyanogen in Acidic Aqueous Solution* **Inorganic Chemistry** (2007) 46, 285-92.
- C14. Péter Nagy, Xiaoguang Wang, Kelemu Lemma, and Michael T. Ashby *Reactive Sulfur Species: Hydrolysis of Hypothiocyanite to Give Thiocarbamate-S-oxide* **Journal of the American Chemical Society** (2007) 129, 15756-7.
- C15. Péter Nagy^{*}, Guy N. L. Jameson, and Christine C. Winterbourn Kinetics and mechanisms of the reaction of hypothiocyanous acid with 5-thio-2-nitrobenzoic acid and reduced glutathione Chemical Research in Toxicology (2009) 22, 1833-40.
- C16. Stephanie M. Bozonet, Amy Scott-Thomas, Péter Nagy, and Margreet C. M. Vissers Hypothiocyanous Acid is a Potent Inhibitor of Apoptosis and Caspase-3 Activation in Endothelial Cells
 Free Radical Biology and Medicine (2010) 49, 1054-1063.
- C17. Péter Nagy and Michael T. Ashby Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Cystine by Hypochlorous Acid to Give N,N'-Dichlorocystine Chemical Research in Toxicology (2005) 18, 919-23.
- C18. Péter Nagy and Michael T. Ashby Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Glutathione Dimer by Hypochlorous Acid and Catalytic Reduction of the Dichloroamine Product by Glutathione Reductase Chemical Research in Toxicology (2007) 20, 79-87.
- C19. Michael T. Ashby and Péter Nagy Revisiting a Proposed Kinetic Model for the Reaction of Cysteine and Hydrogen Peroxide via Cysteine Sulfenic Acid International Journal of Chemical Kinetics (2007) 39(1), 32-38.
- C20. Michael T. Ashby and Péter Nagy On the Kinetics and Mechanism of the Reaction of Cysteine and Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution Journal of Pharmaceutical Sciences (2006) 95(1), 15-18.
- C21. Péter Nagy^{*} Amir Karton, Andrea Betz, Alexander V. Peskin, Paul Pace, Robert O'Reilly, Mark B. Hampton, Leo Radom, and Christine C. Winterbourn Model for the Exceptional Reactivity of Peroxiredoxins 2 and 3 with Hydrogen Peroxide; A Kinetic and Computational Study Journal of Biological Chemistry (2011) 286, 18048-55.
- C22. Gábor Sirokmány, Anna Pató, Melinda Zana, Ágnes Donkó, Adrienn Bíró, Péter Nagy and Miklós Geiszt
 Epidermal Growth Factor-Induced Hydrogen Peroxide Production Is Mediated By Dual Oxidase 1 (2015) Submitted
- C23. Alexander V. Peskin, Andrew G. Cox, Péter Nagy, Philipp E. Morgan, Michael J. Davies, Mark B. Hampton and Christine C. Winterbourn *Rapid Removal of Amino acid, Peptide and Protein Hydroperoxides by Reaction with Peroxiredoxin 2&3*Biochemical Journal (2010) 432, 313-321.
- C24. David Peralta, Agnieszka K. Bronowska, Bruce Morgan, Éva Dóka, Koen Van Laer, Péter Nagy, Frauke Gräter and Tobias P. Dick A proton relay enhances H₂O₂-sensitivity of GAPDH to facilitate metabolic adaptation Nature Chemical Biology (2015) 11, 156-63.
- C25. Jianqiang Xu, Sofi E. Eriksson, Marcus Cebula, Tatyana Sandalova, Elisabeth Hedström, Irina Pader, Qing Cheng, Charles R. Myers, William E. Antholine, Péter Nagy, Ulf Hellman, Galina Selivanova, Ylva Lindqvist, Elias S. J. Arnér The conserved Trp114 residue of thioredoxin reductase 1 has a redox sensor-like function triggering oligomerisation and crosslinking upon oxidative stress related to cell death Cell Death and Disease Nature (2015) 6: p. e1616.
- C26. Péter Nagy*, Zoltán Pálinkás, Attila Nagy, Barna Budai, Imre Tóth, Anita Vasas *Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples*Biochimica et Biophysica Acta invited review for the "Current methods to study reactive oxygen species strengths and limitations" (2014) 1840, 876-891.
- C27. Romy Greiner, Zoltán Pálinkás, Katrin Bäsell, Dörte Becher, Haike Antelmann, Péter Nagy and Tobias P. Dick *Polysulfides link H2S to protein thiol oxidation* Antioxidants and Redox Signaling (2013) 19(15), 1749-1765.
- C28. Péter Nagy* and Christine C. Winterbourn Rapid Reaction of Hydrogen Sulfide with the Neutrophil Oxidant Hypochlorous Acid to Generate Polysulfides Chemical Research in Toxicology Rapid Reports (2010) 23, 1541-1543.

 C29. Anita Vasas, Éva Dóka, István Fábián, Péter Nagy* *Kinetic and thermodynamic studies on the disulfide-bond reducing potential of hydrogen sulfide* Nitric Oxide Biology and Chemistry (2015) 46, 93-101. Hydrogen Sulfide Biology and

Therapeutic Applications special issue, Edited by Prof. Hideo Kimura

- C30. Éva Dóka, Irina Pader, Adrienn Bíró, Katarina Johansson, Qing Cheng, Krisztina Ballagó, Justin R. Prigge, Tobias P. Dick, Edward E. Schmidt, Elias S. J. Arnér and Péter Nagy* Novel persulfide detection method reveals protein persulfide and polysulfide reducing functions of thioredoxin- and glutathione-systems Science Advances (2015) accepted for publication
- C31. Zoltán Pálinkás, Paul G. Furtmüller, Attila Nagy, Christa Jakopitsch, Katharina F. Pirker, Marcin Magierowski, Katarzyna Jasnos, John L.Wallace, Christian Obinger and Péter Nagy* *Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase* British Journal of Pharmacology (2015) 172, 1516-1532.
- C32. Viktória Jeney, László Potor, Péter Nagy, Emese Tolnai, Anita Vasas, Enikő Balogh, Ágnes Gyetvai, Gábor Méhes, Matthew Whiteman, Mark E. Wood, Sándor Olvasztó, György Balla, József Balla Elevated Levels Of H2S Inhibit Hemoglobin-Lipid Interactions In Atherosclerotic Lesions (2015)Benyújtott
- C33. Miriam M. Cortese-Krott, Bernadette O. Fernandez, José LT Santos, Evanthia Mergia, Marian Grman, Péter Nagy, Malte Kelm, Anthony Butler, Martin Feelisch Nitrosopersulfide (ONSS-) accounts for sustained NO bioactivity of S-nitrosothiols following reaction with sulfide Redox Biology (2014) 2, 234-244.
- C34. Miriam M. Cortese-Krott, Gunter GC Kuhnle, Alex Dyson, Bernadette O. Fernandez, Marian Grman, Jenna F. DuMond, Mark P Barrow, George McLeod, Hidehiko Nakagawa, Karol Ondrias, Péter Nagy, S. Bruce King, Joseph Saavedra, Larry Keefer, Mervyn Singer, Malte Kelm, Anthony R. Butler, Martin Feelisch,

The key bioactive reaction products of the NO/H₂S interaction are S/N hybrid species, polysulfides, and nitroxyl.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2015) 112, E4651-60.

C35. Andrea Berenyiova, Marian Grman, Ana Mijuskovic, Andrej Stasko, Anton Misak, Péter Nagy, Elena Ondriasova, Sona Cacanyiovaa, Vlasta Brezova, Martin Feelisch, Karol Ondrias *The reaction products of sulfide and S-nitrosoglutathione are potent vasorelaxants* Nitric Oxide Biology and Chemistry (2015) 46, 123-130. Hydrogen Sulfide Biology and Therapeutic Applications special issue, Edited by Prof. Hideo Kimura

8.3 A dolgozat témájához kapcsolódó meghívott előadások

(fordított kronológiai sorrendben)

- 2016 Nemzetközi Tudományos Bizottsági Tag- Society for Free Radical Research-Europe
- 2016 Nemzetközi Tanácsadó Testületi Tag- 4th International Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide
- 2015 Protein persulfides: Insights into the molecular mechanisms of H2S signaling Meghívott plenáris előadó Joint Meeting of the Societies for Free Radical Research Australasia and Japan, Christchurch, Új-Zéland
- 2015 Superoxide-mediated post-translational modification of tyrosine resideues Meghívott előadó: Society for Free Radical Research- Europe meeting Stuttgart, Germany

- 2015 Mechanistic chemical perspective of thiol redox biology Meghívott előadó: Thiol-based redox switches in life sciences ESF-EMBO conference, Sant Feliu de Guixols, Spain
- 2015 Hydrogen sulfide and redox signaling Meghívott előadó: "Redox Regulation, Oxidative Stress, and Selenoproteins." Medical University of South Carolina in Charleston, S.C.
- 2015 Mechanistic Chemical Perspective of Hydrogen Sulfide Signaling Meghívott előadó: 3rd European Conference on the Biology of Hydrogen Sulfid, Athens, Greece
- 2015 Mechanistic Chemical Perspective of Hydrogen Sulfide Signaling Meghívott előadó: "RISE Enhancing Biomedical Sciences and Biomedical Engineering in Science and Technology "Mayagüez, Puerto Rico
- 2015 Redox biochemistry of thiol proteins and hydrogen sulfide Meghívott szemináriumi előadás LSU Health Shreveport, USA,
- 2014 Mechanistic consideration of sulfide- versus polysulfide-mediated signaling events from a chemist's perspective Meghívott előadó: Third International Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide
- meeting, Kyoto, Japan 2014 Tools and techniques for gasotrasmitters detection; working with gasotransmitters Meghívott oktató: Training School on Gasotransmitters Biology and Chemistry, Capri, Italy
- 2014 Kinetics and mechanisms of thiol redox reactions in relation to their biological functions Meghívott szemináriumi előadás: Redox Biology Seminars, Heidelberg DKFZ, Germany
- 2013 Meghívott előadó: Redox Proteomika az Országos Onkológiai Intézetben Magyar Onkológusok Társaságának XXX-ik Kongresszusa, Pécs;
 Molecular mechanisms of BRAF V600E inhibition and acquired resistance to inhibitors of the MAPK pathway in melanoma malignum. Potential roles of Redox Regulation.
- 2013 Kinetics and mechanisms of thiol oxidation in biological systems Előadó: Debrecen Colloquium on Inorganic Reaction Mechanisms 2013 Conference, Debrecen, Hungary
- 2013 Scavenging of doxorubicin-induced peroxide species by peroxiredoxin 2 in red blood cells Előadó: Eu-ROS COST meeting, Budapest, Hungary
- 2013 Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples Meghívott előadó: European Network on Gasotransmitters COST meeting, Athens, Greece
- 2012 Kinetics and Mechanisms of Thiol Oxidation in Biological Systems Meghívott plenáris előadás: Natural Products and Related Redox Catalysts: Basic Research and Application in Medicine and Agriculture, Aveiro, Portugal
- 2012 Some Redox- and Coordination-Chemical Properties of Hydrogen Sulfide in Relation to its Biological Activities
- Meghívott előadó: European Network on Gasotransmitters COST meeting, Budapest, Hungary 2012 Redox Chemical Studies of Biological Thiols Meghívott szemináriumi előadás: at Saarbrucken Univesrity, Saarbrucken, Germany
- 2012 Interactions of Hydrogen Sulfide with Neutrophil-Derived Oxidants
 Meghívott előadó: First European Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide, Smolnice, Slovak Republic
- 2012 Reaktív Öxigén Származékok a daganatos megbetegedésekben Meghívott előadó: Magyar Onkológusok Gyógyszerterápiás Tudományos Társasága VI Kongresszusa 2012. március 8-10
- 2011 Novel Mechanisms for Superoxide Toxicity- Szuperoxid reakciói fenol szabadgyökökkel és azok biológiai jelentősége Meghívott szemináriumi előadás a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék szemináriumán.
- 2010 Mechanistic Investigation of the High Reactivity and Specificity of Peroxiredoxins with Peroxides

Meghívott előadás a 19th Annual Meeting of the Society for Free Radical Research Australasia, Akaroa, New Zealand

- 2010 Chemical Aspects of Thiol Oxidation in Biology
 - Meghívott szemináriumi előadás: Puget Sound Blood Center, Seattle, WA, USA
- 2010 The Jekyll and Hide Roles of Superoxide in vivo: Mechanistic Investigation of Superoxide Mediated Tyrosine Modifications on Peptides and Proteins Meghívott szemináriumi előadás: University of Washington, Department of Medicine, Seattle, WA, USA
- 2010 Addition of superoxide to tyrosyl radicals in peptides and proteins; a potential route for superoxide toxicity

Kiválasztott előadó: Oxygen Radicals Gordon Research Conference, Ventura, CA, USA

2009 Rapid reaction of superoxide with insulin-tyrosyl radical results in hydroperoxide formation, a kinetic study.

Kiválasztott előadó: 5th Joint Meeting of the Society for Free Radical Research (Australia and Japan) with Mutagenesis and Experimental Pathology Society of Australia, Sydney, Australia 2009 Neutrophil mediated oxidation of opioid peptides

- Meghívott előadás a Brain Health & Repair Research Centre Conference, Dunedin, New Zealand
- 2009 Mechanisms of thiol oxidation in biology. A chemist's perspective Meghívott szemináriumi előadás: University of Otago, Dunedin, Department of Chemistry, New Zealand
- 2009 Redox chemistry of neutrophil-derived oxidants Meghívott szeminárium: University of Otago, Dunedin, Department of Chemistry, New Zealand
- 2009 Superoxide mediated radical reactions of opioid peptides and proteins Meghívott szemináriumi előadás: University of Otago, Dunedin, Department of Chemistry, New Zealand
- 2008 Radical targets for superoxide toxicity Meghívott szeminárium: The Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Department of Chemistry, Zurich
- 2007 Neutrophils, our in vivo cleaning staff, use chlorine bleach to disinfect Meghívott szemináriumi előadás a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék szemináriumán.
- 2007 Thiocyanate is an Efficient Endogenous Scavenger of the Putative Eosinophilic Killing Agent Hypobromous Acid

Meghívott előadás az 5th International Meeting on Human Peroxidases, Akaroa, New Zealand

2005 Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanisms of the Oxidation of Cystine Derivatives by Hypochlorous Acid

Meghívott előadás az 57th Southeast/61st Southwest Joint Regional Meeting of the American Chemical Society, Memphis, Tennessee, USA

9 Röviditések

3MST	3-merkaptopiruvát-szulfurtanszferáz
AAT	aszpartát/cisztein-aminotranszferáz
ApoA-I	zsírszegény apolipoprotein-A-I
ÂTP	adenozin-5'-trifoszfát
BPM	Biotin-PEG11-maleimid
CBS	cisztationin β-szintáz
CD spektroszkópia	cirkuláris dikroizmus spektroszkópia
Cys	cisztein
CvS(=O)SCv	cisztin tioszulfinát észter származék
CySO ₃ H	cisztein-szulfonsav
CySOH	cisztein szulfénsav
CvSOH	cisztein-szulfénsav
CvSX	cisztein-szulfenil-halogenid származék
CSE	cisztationin v-liáz
CSH	cisztein
CSSC	cisztin
DEDA	7 7-dimetil-(5Z 8Z)-ekozadienosay
DMPO	5 5-Dimetil-1-Pirrolin-N-Oxid
DNCB	1-klór-2 4-dinitrobenzol
DOPA	3 4-dihidroxi-fenilalanin
Dox	doxorubicin
DTNB	5 5'-ditiohisz-(2-nitrobenzoesay)
DTT	ditiotreitol vasas
FPO	eozinofil peroxidáz enzim
FPR spektroszkópia	elektron paramágneses rezonancia spektroszkónia
ER	endonlazmikus retikulum
ferril –Hb	ferril-hemoglohin
G6PD	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GAPDH	gliceraldehid_3-foszfát dehidrogenáz enzim
COP	glutation oxido reduktáz
Gov1	glutation perovidáz enzim
Gry	glutaredovin
CSH	redukált glutation
GSNO	nitrozoglutation
GSSG	ovidélt glutation
C220	dutation personalid
	tickerhomót S ovid
$H_2INC(=0)SO$	A hidroni A alanil aildahana 2.5 dién 1 an
HACHD	4-marox1-4-alami-cikionexa-2,5-alen-1-on
	nemoglobin
	A bi logi nego al
HNE HOD#	4-nidroxi-nonenal
HOBI	himotomossav
HOUI	nipokiorossav
HOHICA	3a-nidrox1-6-oxo-2,3,3a,6,7,7a-nexanidro-1H-indol-2-karbonsav
HOSCN	nipitiocoanit
HOX	niponalogenessav
HRP	tormaperoxidaz
нээн	diszunia EZ Link Listereti DEC2 kietis
IAB	EZ-LINK JOGACETII-PEG2-DIOTIN
IIVIS Le de	mitokondrialis membranon beluli ter
Indo	indomethacin (Cox 1,2 inhibitor)
Leu-Enk	leucin-enketalin

Leu-Enk-OOH	Leu-Enk hidroperoxid
LPO	laktoperoxidáz enzim
MAFP	metil arakidonil fluorofoszfonát
Mb	mioglobin
Met-Enk	metionin-enkefalin
metHb	methemoglobin (Fe ^{III} Hb)
MMTS	metil-metán tioszulfonát
MnSOD	mangán szuperoxid dizmutáz
MPO	mieloperoxidáz
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NADPH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NDC	cisztin N.N'-diklóramin származéka
NDG	oxidált glutation <i>bis</i> -N-kloro-c-L-glutamil származéka
NDGA	nordihidroguarinsav
NEM	N-etilmaleimiddel
NMR spektroszkónia	mágneses magrezonancia spektroszkónia
NO	nitrogén monoxid
	perovinitrit
oxyHb	oxyhemoglobin (Fe ^{II} Hb)
DRS	foszfátnuffer fiziológiás sóoldathan
	termék kompleye
	forbol mirisztát agetát
r IVIA Drv	peroviredovin
DTEN	foszfetéz és tenzinhomológ enzim
F ILIN DTD	protain tirozin forzfatóz
	realtána komplovak
	reaktári s komplexek
	reaktiv Oxigeti Szálillázek
SA SDO	szanchannin (npidekdői szannaző ketőaldenidek bontasála)
SDU	szunia-aloxigenaz
	S Nitrozo N sostiluccio
SNAP	S-INITOZO-IN-acetifpementamin
20	szulfit-oxidaz
SOD	szuperoxid dizmutaz
S _p	peroxidativ cisztein tiol
SPO	nyal-peroxidaz
SQR	szulfid-kinon-reduktaz
SQR-SSH	szulfid-kinon-reduktaz-perszulfid
Sr	redukalo cisztein tiol
SSNO ⁻	nitrozoperszultid
SULFI/NO	N-nitrozohidroxilamin N-szultonát
TCEP	trisz(2-karboxietil)foszfin
TNB	5-tio-2-nitrobenzoesav
Trx	tioredoxin
TrxR	tioredoxin reduktáz
TS	átmeneti állapot
TST	tioszultat:glutation szulfurtranszferáz
Tyr-OOH	tirozin-hidroperoxid
vvt	vörösvértest
WB	Western-blot
XO	Xantin oxidáz