



Országos Onkológiai Intézet

Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály

OXIDATÍV STRESSZ és REDOXIJELÁTVITEL

Betekintés a redoxibiológia molekuláris világába

Nagy Péter

MTA Doktori értekezés

2015



1. Bevezetés

A biológiai rendszerekben lejátszódó redoxireakciók meghatározó szerepet játszanak fiziológiai és patofiziológiai folyamatokban egyaránt. A szakirodalomban leginkább Reaktív Oxigén Származékok (ROS-ok) gyűjtőnéven emlegetett oxidálószerke és szabadgyökök széles skálájának vagyunk kitéve mindennapi életünk folyamán. ROS-ok képződését indukálja például a napsugárzás, radioaktív sugárhatás, egyes gyógyszerek, xenobiotikumok, mérgező anyagok (alkoholfogyasztás, dohányzás). A ROS-ok biomolekulákat roncsoló redoxireakciói kulcsszerepet játszanak többek között a gyulladásos folyamatok, daganatos megbetegedések kialakulásában/progressziójában és az öregedési folyamatokban. A redoxibiológia ezért eleinte elsősorban a ROS-ok közömbösítésére hivatott antioxidánsok kutatásával foglalkozott. A szervezetben nagy számban találhatók olyan enzimek (mint például a *peroxireoxin*, *tioeredoxin* fehérje család, vagy a *szuperoxid diszmutáz*, *kataláz* stb.) és kismolekulák (pl. glutation (GSH), aszkorbinsav stb.) melyek elsődleges funkciója a ROS-ok közömbösítése, redukálása. Az oxidatív terhelés ellen sejtjeink adaptációs folyamatok segítségével védekeznek, melyek közül meghatározó szerep jut az antioxidáns enzimtermelés serkentésének. Mára már az is elfogadott tény, hogy a ROS-oknak nem csak kedvezőtlen, toxikus hatásai vannak, hanem alapvető fiziológiai folyamatok vezérléséért is felelősek. Sejtjeinkben ROS termelő enzimek biztosítják a megfelelő redoxiegyensúlyt, amelynek felborulása betegségek kialakulásához vezethet. A legfontosabb ROS termelő enzimescsoport a *NADPH oxidázok* (Nox), amelyek oxigén redukciójával szuperoxidot gyártanak. Az első felfedezett Nox enzim a Nox2 a fehérvérsejtjeink zömét kitevő neutrofil fagociták antibakteriális tevékenységének alapvető komponense, amely a fagocitózist követően nagy mennyiségű szuperoxidot termel a fagoszómás térbe. A szuperoxid, egyéb enzimreakciók sokaságán keresztül, ROS-ok arzenáljának prekursora, amelyeket a neutrofilok a baktériumok pusztítására használnak. Az így termelt ROS-oknak fontos szerep jut a gyulladás kialakulásában és jótékony hatásaiban is. A Nox enzimescsoportnak mára már 6 másik tagját is ismerjük, melyek szuperoxid és hidrogén-peroxid termelése révén redoxireakció kaszkádok beindításával vezérlik a sejtben belüli jelátviteli folyamatokat. Többek között, a sejtben belüli kommunikáció egyik alappillére, a foszforilációs folyamatoknak az irányításában is döntő szerepet vállalnak, amelyek napjainkban a daganatos megbetegedések gyógyításában áttörésnek számító célzott terápiás eljárások elsődleges célpontjai.

A fent példaként említett alapvető fiziológiai jelentőségű folyamatokra komoly bizonyítékok találhatók a dinamikusan fejlődő redoxibiológia szakterületen, de a biológiai hatásokért felelős redoxireakciók molekuláris mechanizmusai kevésbé ismeretesek. Kutatómunkánk ezért a ROS-ok biológiailag fontos reakciópartnereikkel lejátszódó redoxireakcióira és ezek biokémiai jelentőségének tanulmányozásaira összpontosít.

A szuperoxid szabadgyök toxikus és jelátvitelben betöltött szerepei nem tisztázottak, nagyrészt annak következtében, hogy reakciója kevés biológiai molekulával kedvezményezett a diszmutációs folyamathoz képest. Az értekezésem első nagy fejezetében leírt kutatómunkánkat azzal a céllal kezdtük el, hogy a szuperoxid tirozin-szabadgyökökkel való reakcióinak mechanizmusait kémiai szemszögből mélyebben megértsük. A fiziológiás körülmények között képződő tirozin-szabadgyökök szuperoxiddal való reakcióit modellrendszerek széles skáláját felállítva tanulmányoztuk.

A ROS-ok, biológiai rendszerekben legnagyobb reaktivitást általában tiolokkal szemben mutatnak.^{B2, B3, C14} Az értekezés második fejezetében összefoglalt kutatási eredményeink elsősorban Cys-tiolok, különböző ROS-okkal való, biológiailag releváns redoxireakcióinak tanulmányozását tűzte ki célul, izolált aminosav, peptid, fehérje illetve sejtes rendszerekben egyaránt.

A legkisebb tiolnak, a hidrogén-szulfidnak, az élő szervezetekben meghatározó jelátviteli szerepköréit írták le a közelmúltban.^{B1, C9, C12} Ez egy új, dinamikusan fejlődő szakterület és jelenlegi kutatási programunk középpontjában ez áll. Munkánk leginkább a hidrogén-szulfid biológiai funkcióit leíró reakciók molekuláris mechanizmusainak megértését célozta meg.

2. Kísérleti módszerek

Munkánk során a reakciók követésére számos kinetikai módszert használtunk. Egyszerűbb kismolekulák reakcióit „stopped-flow”, „quenched-flow”, impulzus radiolízis technikák, valamint kézi keverés módszerével vizsgáltuk. Fehérjék esetén ezek mellett új enzimkinetikai mérőmódszereket dolgoztunk ki az adott enzim tulajdonságait figyelembe véve. A reakciók kiindulási anyagait, közttermékeit és végtermékeit többek közt NMR spektroszkópia, tömegspektrometria, ionkromatográfia, nagynyomású fordított fázisú folyadékkromatográfia (HPLC), spektrofotometria, cirkuláris dikroizmus spektroszkópia, spektrofluorimetria, gél-elektroforézis, Western Blot analízis technikák segítségével

vizsgáltuk. A sejtes, illetve szövettani vizsgálatokat változatos biokémiai és sejtbiológiai módszerekkel végeztük, például konfokális és egyéb fluoreszcens mikroszkópia, sejtproliferáció és toxicitás vizsgáló módszerek, shRNS-sel végzett transzfekció, 2D gél-elektroforézises technikák (diagonális, redoxi proteomikai és expresszió analízis), tömegspektrometria alapú proteomika, igénybevételével hajtottuk végre. A kutatásainkhoz használt egészséges, illetve rákos sejtvonalakat a sejttenyésztő laboratóriumunkban növesztettük, tisztaságukat rendszeresen ellenőriztük PCR technikán alapuló mikoplazma szennyeződésre illetve baktérium és gombás szennyezőkre. A neutrofilokat és vörösvértesteket egészséges önkéntesek vénás véréből izoláltuk az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága által kiadott etikai engedélyben (BPR-021/00084-2/2014) jóváhagyott betegtájékoztató és beteg beleegyező nyilatkozat kitöltése után. A neutrofilokat frobol mirisztát acetáttal aktiváltuk és ROS termelő funkcióikat több publikált, illetve általunk kifejlesztett módszer segítségével vizsgáltuk. Ezen túlmenően, kémiai kísérleteink eredményeit alapul véve több új Cys poszttranszlációs módosulatót vizsgáló proteomikai módszert fejlesztettünk ki és használunk. A hidrogén-szulfid kémiai tulajdonságainak vizsgálataira és fiziológiai rendszerekben való detektálására is több módszert állítottunk be és dolgoztunk ki, amelyeket nemcsak saját kutatásainkhoz, de több külföldi kutatócsoport megkeresésére szakmai együttműködések keretein belül is széles körben alkalmazunk.

3. Új tudományos eredmények

I. Igazoltuk, hogy a peptidekben kötött Tyr-szabadgyökök reakciója szuperoxiddal nagyon kedvező és gyors, a reakció termékeként biciklusos Tyr-hidroperoxid származékok képződnek. HPLC-hez csatolt tandem tömegspektrometriás módszerek segítségével jellemeztük a képződő hidroperoxidokat több modell peptiden. Mechanizmus javaslatot tettünk annak értelmezésére, hogy miért kedvezményezett a hidroperoxid képződéséhez vezető addíciós reakcióút akkor, ha a Tyr a peptid N-terminális pozíciójában található, vagy amincsoportok veszik körül.^{C23}

Részletes mechanisztikus vizsgálataink új reakció utakra világítottak rá a Tyr-hidroperoxid biológiai kénvegyületekkel való reakcióiban. Met-tartalmú Tyr-peptidek szuperoxiddal való oxidációjakor a Tyr-hidroperoxid köztiterméként képződik és gyors intramolekuláris oxigén transzfer útján oxidálja a Met tioétercsoportját. Cys- tiolokkal a Tyr-

hidroperoxidok kétlépéses reakcióban egy konjugált Tyr-Cys keresztkötést tartalmazó monoxidszármazék képződése közben reagálnak.^{C15}

II. Megállapítottuk, hogy humán neutrofilek nemcsak termelik a gyulladásos fájdalom csökkentésére szolgáló neuropeptideket, de aktivációjuk hatására Tyr-hidroperoxidok képződésével oxidálják is azokat. A neutrofilek *mieloperoxidáz* (MPO) enzimeinek jó szubsztrátjai a Tyr- tartalmú neuropeptidek. A katalitikus ciklusban képződő Tyr-szabadgyökökből a fehérvérsejtek Nox2 enzime által termelt szuperoxid segítségével Tyr-hidroperoxidok képződnek. Lévén, hogy az opioid receptorhoz való kötődéshez a neuropeptidek intaktnak N-terminális Tyr-csoportja szükséges, azt feltételeztük, hogy ezen reakciók gátolhatják a neutrofilek által indukált gyulladásos fájdalom csökkentését.^{C20}

III. Ámbrás cet mioglobinját használva modell fehérjeként megmutattuk, hogy az enzimatis folyamatokban képződő Tyr-szabadgyökök is hatékonyan reagálnak szuperoxiddal a peptidek esetén karakterizált reakcióutakon. Az *ámbrás cet mioglobin* H₂O₂-dal való reakciójában a Tyr151 aminosavon képződő Tyr-szabadgyök reagál szuperoxiddal Tyr151-hidroperoxid képződése közben. GSH jelenlétében a Tyr151-hidroperoxid redukálódik és a GSH konjugálódik a keletkezett Tyr151 módosult, biciklusos vázán található kettőskötéséhez.^{C21}

IV. Valószínűsítettük, hogy oxidatív stressz hatására képződő fehérje-Tyr-szabadgyökök is reagálnak szuperoxiddal. Impulzus radiolízis technika segítségével végzett kinetikai illetve tömegspektrometriás szerkezetvizsgáló módszerek sorozata rámutatott, hogy inzulinon generált Tyr-szabadgyökök kedvezően és gyorsan reagálnak szuperoxiddal a peptideknél karakterizált összes reakció utat igénybe véve.^{C10}

Bizonyítottuk, hogy *Humán Apolipoprotein A1*-et a daganatos betegek sugárterápiájára használt készülékekkel besugározva Tyr-hidroperoxid és ditirozinszármazékok képződnek, melyeknek következtében a fehérje koleszterin szállító képessége csökkent. Mind a 7 Tyr-on igazoltuk a hidroperoxid képződést. Az irodalmi adatoknak megfelelően a legnagyobb redoxiaktivitást a Tyr192 mutatta.

V. Kinetikai, szerkezetvizsgáló és sejtbiológiai módszerek segítségével jellemeztük az MPO és a *laktoperoxidáz* enzimek SCN⁻-t oxidáló reakcióiban képződő hipotiocianitot és néhány biológiailag fontos reakcióját. Igazoltuk, hogy az enzimreakció

terméke OSCN^- és nem ONCS^- vagy OCNS^- . C31, C29 Az OSCN^- nagy pH-n egy új Cys reaktív molekula, a tiokarbamát S-oxid képződésével hidrolizál.^{C24}

Megállapítottuk, hogy HOSCN nem csak enzimatis úton képződhet, hanem a szintén peroxidáz enzim termelte HOBr , SCN^- -nal való diffúzió kontrollált reakciójában is. Részletes kinetikai vizsgálataink segítségével átfogó mechanizmus javaslatot tettünk a HOBr és SCN^- reakciójára.^{C32}

Kinetikai vizsgálataink eredményeképp részletes mechanizmust dolgoztunk ki a hipotiocianit tiolokkal való reakcióinak értelmezésére. Régóta köztudott, hogy a biológiai rendszerekben a hipotiocianit dominánsan Cys-tiolokkal reagál, de ennek a reakciónak a kinetikai és mechanisztikus vizsgálatait először mi írtuk le.^{C22}

Bebizonyítottuk, hogy a HOSCN a *kaspáz* enzimmel való reakción keresztül gátolja az endotél sejtek indukált apoptotikus sejthalálát. Igazoltuk, hogy kis mennyiségű HOSCN is elegendő HUVEK sejtek apoptotikus sejthalálának a gátlásához, a *kaspáz* fehérjével való specifikus reakció eredményeképp bekövetkező enzimaktiválás hatására.^{C19}

VI. Részletes kinetikai modellszámítások, termék és közttermék analízis segítségével jellemeztük a Cys-szulfénsavat és Cys-tioszulfínát észtert és azok néhány biológiailag fontos reakcióját. Cáfoltuk a Cys aminosav H_2O_2 -dal való reakciójában képződő szulfénsavszármazék Cys-szel való reakciójára vonatkozó másodrendű sebességi állandó korábban leírt értékét. Vizsgálataink rámutattak, hogy a valós érték legalább 2 nagyságrenddel nagyobb a javasolt $\sim 700 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sebességi állandónál.^{C33, C30}

Szintetikus előállítottuk a Cys-tioszulfínát észter származékát, meghatároztuk savi disszociációs állandóit és részletes kinetikai modellt dolgoztunk ki a vegyület hidrolízisére. Az általunk meghatározott savi disszociációs állandók segítségével vizsgáltuk a Cys-tioszulfínát észter hidrolízisének pH függését. 16 lehetséges reakcióutat javasoltunk és NMR spektroszkópia, valamint tömegspektrometria segítségével karakterizáltuk a reakcióban közti- vagy végtermékként keletkező tioszulfonát-észter származékot.^{C27}

A HOCl és Cys-tioszulfínát észter Cys-szel való reakcióiban képződő Cys-szulfénsav, Cys-szel való reakcióját kinetikai szempontból vizsgáltuk és részletes mechanizmus javaslatot állítottunk fel. Meghatároztuk a Cys-szulfénsav savi disszociációs állandójának lehetséges tartományát és a nagy pH-n mért kinetikai adatok alapján becsültük a $\text{pH} = 7$ -re extrapolált másodrendű sebességi állandó értékét a Cys-szel való reakciójára. Ez az irodalomban az első kinetikai vizsgálat a Cys-szulfénsav reakcióit tekintve.^{C25, C26}

VII. Részletes kinetikai modelleket dolgoztunk ki a cisztin és az oxidált glutation HOCl-val való reakciójára. Bizonyítottuk, hogy a reakciókban a megfelelő N,N'-klóramin-származékok képződnek. Megállapítottuk, hogy pH = 7-nél a cisztin⁻ és a GSSG³⁻ HOCl-val való reakciói a domináns reakcióutak. A diklóramin-származékok képződésekor a sebességmeghatározó lépés a monoklóramin képződése. ^{C34}

Megmutattuk, hogy az oxidált glutation diklóramin származékát a *glutathion reduktáz* enzim katalitikusan redukálja GSH-vá. Enzimkinetikai vizsgálataink eredményeképp mechanizmus javaslatot tettünk. ^{C28}

VIII. Kinetikai, biokémiai és sejtbioológiai módszerekkel jellemeztük a Prx fehérjecsalád tagjainak peroxidokkal való néhány biológiailag fontos reakcióját. Mechanizmus javaslatot tettünk a Prx enzimes család H₂O₂-dal való kiemelkedő reaktivitásának értelmezésére. Az enzimek aktív centrumban található két Arg aminosavnak kulcsszerepet tulajdonítottunk. Javasolt modellünk alapján guanidinium funkciós csoportjaik segítségével, a két Arg H-hídkötéseken keresztül aktiválja a H₂O₂-ot. ^{C16}

Bizonyítottuk, hogy endotél sejtek *EGFR* receptorainak aktiválása a *Duox1* enzimen keresztül H₂O₂ termeléshez vezet az extracelluláris térben, amely a sejtbe visszajutva oxidálja a citoszolban lévő Prx1 és Prx2 fehérjéket. Ezzel igazoltuk, hogy a *Duox1* a külső membránban helyezkedik el és a szuperoxidot a sejten kívüli térbe termeli. A Prx oxidáció másodlagos folyamatként bekövetkező *tioredoxin* oxidációt is detektálni tudtuk. ^{C2}

Bebizonyítottuk, hogy a Prx fehérjecsalád nemcsak a H₂O₂ katalitikus redukcióját, hanem aminosav, peptid és fehérje peroxidszármazékok redukcióit is katalizálja. Többek között házi készítésű „quenched-flow” és egy általunk kifejlesztett HPLC-hez csatolt tömegspektrometriás módszer segítségével megmértük az általunk előállított peroxid-származékok Prx2 illetve Prx3-al való reakcióinak sebességi állandóit. A reakciók biológiai potenciálját sejtes rendszerekben demonstráltuk. ^{C18}

Bebizonyítottuk, hogy a doxorubicin kezelés hatására vörösvértestekben képződő H₂O₂ közömbösítésében és a nemkívánatos *hemoglobin* oxidáció elkerülésében a Prx2-nek kulcsszerepe van. Kísérleteink rávilágítottak, hogy a *glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz*-hiányos betegek doxorubicin kezelése hemolitikus anémiát okozhat, mert ezekben az esetekben valószínűsíthetően nem megfelelő a Prx2 redukálásához szükséges NADPH utánpótlás.

IX. Javaslatokat tettünk redoxireakciók által vezérelt enzimreakciók molekuláris mechanizmusaira. A *glicerinaldehyd-foszfát-3-dehidrogenáz* (GAPDH) enzim aktív centrumában egy H-híd kötés rendszert azonosítottunk, amely felelős a H_2O_2 -dal való nagy reaktivitásért. Pontmutánsok segítségével igazoltuk, hogy ez a mechanizmus fontos redoxikapcsoló szerepet tölt be az enzim sejten belüli működésében. A megnövekedett oxidatív terheléshez való metabolikus adaptáció egyik fontos eleme lehet a GAPDH glikolitikus aktivitásának ilyen kikapcsolása, mely a pentóz-foszfát ciklus aktiválásán keresztül megnövekedett NADPH utánpótlást biztosít a Prx-ek hatékony redukciójához.^{C4}

A *tioredoxin-reduktáz-1* (TrxR1) enzim felszínén lévő Trp114 aminosav irreverzibilis redoxi kapcsolóként működik, amelynek oxidációja két TrxR1 fehérje Trp114 aminosav komponenseit összekötő kovalens kötésen keresztül, TrxR1 dimer képződéshez vezet. A kimagasló oxidatív terhelés okozta apoptotikus sejthalál egyik potenciális mechanizmusa lehet a TrxR1 ilyen irreverzibilis inaktiválása.^{C5}

X. Kinetikailag jellemeztük a hidrogén-szulfid HOCl-val és klóramin-származékokkal való reakcióit. Bebizonyítottuk, hogy a hidrogén-szulfid HOCl-val való reakciója poliszulfidok képződéshez vezet és sebessége pH 7,4-nél közelít a diffúzió kontrollált határhoz. Kinetikai méréseink eredményeképp javaslatot tettünk a reakció mechanizmusára.^{C17}

Igazoltuk, hogy a glicin és a taurin klóraminszármazékainak hidrogén-szulfiddal való reakciói is poliszulfidok képződését eredményezik. Mindkét reakcióra részletes mechanizmus javaslatot tettünk és a köztiterméként képződő diszulfid (HSSH) diszproporciós reakciójának sebességi állandóját is megbecsültük.

XI. Részletesen vizsgáltuk a sejten belüli jelátviteli folyamatokban fontos perszulfidok képződésének és bomlásának mechanizmusait és azok biológiai jelentőségeit. Megmutattuk, hogy a hidrogén-szulfid-oldatokban nyomokban jelen lévő poliszulfid szennyeződés hatására a *foszfatáz és tenzin homológ* (PTEN) fehérje reverzibilisen inaktiválódik. Az inaktiváció az enzim aktív centrumában lévő Cys71- és Cys124-tiolokon képződő perszulfid-/ triszulfidszármazékok képződésének tulajdonítható.^{C13}

Modell diszulfidok H_2S -dal való reakcióira részletes modellt dolgoztunk ki. Megállapítottuk, hogy a reakciópartner diszulfid kémiai tulajdonságai nagymértékben befolyásolják a keletkezett termékek részecskeeloszlását és a reakciók sebességét.^{C7}

Egy új módszert dolgoztunk ki a fehérje perszulfidok mérésére. Ez az első olyan módszer, amely intakt sejteken belül is képes fehérje perszulfidok detektálására.^{C1}

Bebizonyítottuk, hogy a *tioredoxin* (Trx) és *glutation* enzim családok által vezérelt redukáló rendszerek felelősek a fehérje perszulfidok és a szerves poliszulfidok redukációjáért. Izolált fehérjéken, sejtes rendszerekben és egér májban egyaránt megmutattuk, hogy a Trx és GSH enzimrendszerek meghatározó szerepet töltenek be a fehérje Cys-tiolok, perszulfidokból való regenerálásában és a szulfánkén-vegyületek homeosztázisában.^{C1}

XII. Jellemeztünk a hidrogén-szulfid MPO-val és hemoglobinnal való néhány fontosabb reakcióját és azok biológiai jelentőségeit. Bizonyítottuk, hogy a hidrogén-szulfid nem csak reverzibilisen és nagyon hatékonyan gátolja a humán MPO enzim aktivitásait, de szubsztrátja is az enzim oxidált köztitermékeinek. Részletes kinetikai modellt dolgoztunk ki a hidrogén-szulfid MPO-val való enzimatis reakcióinak magyarázására, amely példaértékkel szolgál a redoxi-jelátvitel és a hidrogén-szulfid vezérelte jelátviteli folyamatok összefonódására.^{C6}

Igazoltuk, hogy a hidrogén-szulfid hatékonyan redukálja a *hemoglobin* toxikus oxidált ferrilszármazékait szulfhemoglobin képződése közben. Ennek a felfedezésnek komplikált humán ateroszklerotikus léziók kialakulásában fontos védő szerepe van. Bizonyítékot szereztünk arra vonatkozóan, hogy a *methemoglobin* és *oxihemoglobin* formák H₂O₂-dal való reakcióiban a hidrogén-szulfiddal szemben legalább két különböző reaktivitású oxidált *hemoglobin* forma képződik.

XIII. Mechanizmus javaslatokat tettünk a hidrogén-szulfid és a NO által vezérelt jelátviteli folyamatok összefonódásának molekuláris mechanizmusaira. Megállapítottuk, hogy a hidrogén-szulfid NO-dal, nitrozotiolokkal és különböző, NO-donor molekulákkal való reakcióiban három főtermék képződik. Kinetikai és szerkezetvizsgáló módszerek segítségével azonosítottuk a nitrozo-perszulfid (SSNO⁻), poliszulfidok és N-nitrozo-hidroxilamin N-szulfonát (SULFI/NO) termékeket és modell javaslatokat tettünk a képződésükre és bomlásaikra.^{C3, C11, C8}

Igazoltuk, hogy a nitrozotiolok és a hidrogén-szulfid reakcióiban képződő három főtermék különböző kémiai és biológiai tulajdonságokkal rendelkezik: 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 aktivációja és ezen keresztül a vérnyomás szabályozása) lehet felelős. C11 2) A poliszulfidok mint a szulfid NO-dal való reakciójának, illetve az SSNO⁻ bomlási reakcióinak termékei, szintén vérnyomás csökkentő hatásúak. 3) A SULFI/NO NO- és HNO-donorként viselkedik és moderáltan vérnyomás csökkentő hatása mellett fokozza a szívizomzat teljesítményét (pozitív ionotróp hatású).^{C3}

4. Az eredmények lehetséges hasznosítása

A Redoxibiológia és a hidrogén-szulfid biológiai szerepeinek kutatási területein számos ellentmondásos közlemény található a szakirodalomban. Ennek egyik meghatározó oka gyakran a biológiai funkciók háttérében álló kémiai folyamatok ismereteinek a hiánya.

A dolgozatban ismertetett kinetikai és mechanisztikus vizsgálataink mélyebb betekintést adnak a szuperoxidnak tirozin-szabadgyökökkel, a ROS-oknak aminosav, peptid és fehérje ciszteinszármazékokkal és a hidrogén-szulfidnak cisztein-tiolokkal, fémcentrumokkal illetve NO-donor molekulákkal való reakcióinak molekuláris értelmezéseibe, amelyekkel több ellentmondás lehetséges okára sikerült rávilágítanunk és ezáltal segíteni a további alapkutatásokat.

A szuperoxid által módosított Tyr aminosav komponenseknek, a fehérjék oxidált Cys módosulatainak, a hidrogén-szulfidnak és a perszulfidszármazékoknak a sejtekben való detektálásaira kidolgozott új módszereink minden bizonnyal segíteni fogják a tanulmányozott reakciók bonyolult biológiai rendszerekben betöltött szerepeiknek tisztázását, ezzel mélyebb betekintést adva alapvető biológiai hatások molekuláris mechanizmusaiába.

Az alapkutatáson túl gyakorlati alkalmazhatóság tekintetében kiemelném, hogy eredményeink jelentőséggel bírhatnak a daganatos és egyéb betegségek gyógyításában áttörésnek számító célzott terápiák területén, amelyek megjelenése a sokat emlegetett személyre szabott orvoslás korszakának az előfutáraként tekinthető. A célzott terápiák az alapkutatások eredményeképp feltérképezett egészséges és malignus sejtek közti különbségeket használják alapul a gyógyszerfejlesztésre. A módszer leggyengébb pontja az, hogy a betegekben, sok esetben viszonylag rövid idő alatt, rezisztencia alakul ki a kezelésre. Ennek gyakori oka, hogy a célzott, mutációt hordozó fehérje által vezérelt jelátviteli útvonal szerepét egy másik jelátviteli útvonal veszi át. A jelenleg alkalmazásban lévő terápiás eljárások a foszforilációs jelátviteli utakra fókuszálnak. Egyre nagyobb figyelmet kap

manapság azonban a foszforilációs folyamatok illetve ezektől független sejtfunkciók redixivezrlése is. Eredményeink ezért hozzájárulhatnak a célzott terápiás kezelésekre való rezisztencia mechainusainak megértéséhez, illetve rávilágíthatnak az egészséges és malignus sejtek biológiai funkciói között eddig ismeretlen különbségekre, melyek új, hatékonyabb gyógyszerfejlesztésre adhatnak lehetőséget.

5. Tudománymetriai adatok

5.1 Tudományos közlemények

Összes közleményeinek száma	40
ebből első vagy levelező szerzőként	28
egy-szerzős közlemény	2
Közlemények SCI referált folyóiratokban	35
Összefoglaló közlemények	4
Kongresszusi kiadványban (proceedings: teljes munka, nem rövid kivonat)	1
Összes dolgozatának idézettsége, önhivatkozás nélkül	605
Közleményeinek összesített impakt faktora	176,8

5.2 A rangos közleményeinek minősítése

A pályázó által minősítésre kiválasztott dolgozatok száma	20
A kiválasztott dolgozatok összesített impakt faktora	113,08
A dolgozatok összes idézettsége	433
A pályázóra jutó frakcionált dolgozatszám	6,36
A pályázóra jutó frakcionált hatás	31,72
A pályázóra jutó frakcionált idézettség	149,91

6. Publikációk

6.1 A dolgozatban említett könyvfejezetek

A *-gal jelzett könyvfejezetben levelező szerző vagyok.

B1. **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

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**; Julie D. Becker; Rachael C. Mallo and Michael T. Ashby

The Jekyll and Hyde Roles of Cysteine 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.

6.2 A dolgozatban összefoglalt tudományos közlemények

A *-gal jelzett cikkekben levelező szerző vagyok.

C1. Éva Dóka, Irina Pader, Adrienn Bíró, Katarina Johansson, Qing Cheng, Krisztina Ballagó, Justin R. Prigge, Daniel Pastor-Flores, 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
(2015) **Science Advances** közlésre elfogadva

C2. 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) Benyújtott

- C3. 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-E4660.
- C4. 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, 156-163.
- C5. 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. *Faculty of 1000 prime recommended*
- C6. 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.
- C7. Anita Vasas, Éva Dóka, István Fábíán, **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
- C8. Andrea Berenyiova, Marian Grman, Ana Mijuskovic, Andrej Stasko, Anton Misak, **Péter Nagy**, Elena Ondriasova, Sona Cacanyiova, 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

- C9. 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.
- C10. Andrew Das, Thomas Nauser, Willem H. Koppenol, Anthony J Kettle, Christine C. Winterbourn and **Péter 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.
- C11. 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.
- C12. **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.
- C13. 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.
- C14. **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), 1623-1641.

- C15. **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, 26068-26076.
 Spotlighted in *Chemical Research in Toxicology* (2012) 25, 1544
- C16. **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, 18048-18055.
- C17. **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.
- C18. 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.
- C19. 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.
- C20. **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, 792-799.
- C21. 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, 1540-1547.

- C22. **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, 1833-1840.
- C23. **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, 14723-14733.
- C24. **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, 15756-15757.
- C25. **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, 8838-8846.
- C26. **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, 14082-14091.
- C27. **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, 1364-1372.
- C28. **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.

- C29. **Péter Nagy**, Kelemu Lemma, and Michael T. Ashby
Kinetics and Mechanism of the Comproportionation of Hypothiocyanous Acid and Thiocyanate to Give Thiocyanogen in Acidic Aqueous Solution
Inorganic Chemistry (2007) 46, 285-292.
- C30. 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.
- C31. **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, 12610-12616.
- C32. **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, 587-593.
- C33. 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.
- C34. **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, 919-923.

6.3 A dolgozat témájához kapcsolódó meghívott előadások

(fordított kronológiai sorrendben)

- 2016 *Nemzetközi Tudományos Bizottsági Tag- Society for Free Radical Research-Europe, Budapest*
- 2016 *Nemzetközi Tanácsadó Testületi Tag- 4th International Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide, Nápoly*
- 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 residuees
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 H₂S, 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 gasotransmitters 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 Redox Proteomika az Országos Onkológiai Intézetben
Meghívott előadó: Magyar Onkológusok Társaságának XXX-ik Kongresszusa, Pécs;
- 2013 Molecular mechanisms of BRAF V600E inhibition and acquired resistance to inhibitors of the MAPK pathway in melanoma malignum. Potential roles of Redox Regulation.

- Meghívott előadó: Magyar Onkológusok Társaságának XXX-ik Kongresszusa, Pécs*
- 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
- 2012 Redox Chemical Studies of Biological Thiols
Meghívott szemináriumi előadás: at Saarbrücken University, Saarbrücken, 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 Oxigén 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